

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

SPIRALEN UND CHROMOMEREN IN DER MEIOSIS VON BELLEVALIA ROMANA

Von

FRIEDRICH OEHLKERS und PAUL EBERLE

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 30. Juli 1956)

A. Einleitung

Die Frage nach der Längsstruktur der Chromosomen hat insbesondere für die Meiosis der Pflanzen bisher noch keinerlei zufriedenstellende Beantwortung erfahren. Eine genauere Schilderung der Problematik, die hier vorliegt, findet sich z. B. bei LINNERT 1955, und die vorliegende Arbeit soll zu den hier gegebenen Fragen Stellung nehmen bzw. zu weiterer Arbeit anregen. Wir können uns also einleitend sehr kurz fassen und angeben, in welcher Weise wir uns die Lösung der Fragen denken. Es scheint notwendig zu sein, die Morphologie der Chromosomen in den einzelnen Stadien der Meiosis sehr viel genauer als bisher zu erfassen. Dann wird es vielleicht möglich sein, klarere Einsichten in die Wechselbeziehungen zwischen „Chromomeren“ und Spiralen zu finden. Letztere beispielsweise werden für die Pachytänchromosomen von verschiedenen Autoren konstatiert (LINNERT 1955, EBERLE 1956), von anderen hingegen vollkommen ignoriert (LIMA-DE-FARIA 1952). Ferner werden sich Anschauungen über die Verkürzung der Chromosomen im Ablauf der Meiosis gewinnen lassen und hoffentlich auch über Eu- und Heterochromatin, das gerade in der Arbeit von LINNERT (1955) so ausführlich Gegenstand der Erörterung war.

B. Material und Methode

Als Material wurde die Meiosis in den männlichen Gonotokonten (PMZ) von *Bellevalia romana* verwendet. Die Fixierung erfolgte mit Flemming-Heitz und die anschließende Färbung mit 1%igen Orcein¹ (Nr. 7071 Merck). Vielfach wurde in einer 0,5%igen Orceinlösung in Carnoy (Alkohol-Eisessig 3:1) unmittelbar fixiert und schwach angefärbt, so daß nach wenigen Stunden eine Untersuchung mit der Phasenkontrast-Einrichtung (Zeiss Opton W-Stativ) möglich war. Gleichzeitig wurden Beobachtungen mit normalem Kondensor und dem Apochromaten von Zeiss durchgeführt. Sämtliche Aufnahmen erfolgten auf Platten mit Hilfe der großen optischen Bank von Zeiss.

¹ Herrn Kollegen BAUER danke ich sehr für die freundliche Übermittlung seiner Erfahrungen mit der Orcein-Färbung. Daß diese sich auch bei unseren Objekten in einer Modifikation gut bewährt hat, zeigt die folgende Arbeit. OEHLKERS. — Das verwendete Mikroskop wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt, wofür wir herzlich danken.

C. Empirischer Teil

Wir beginnen mit dem *prämeiotischen Ruhekern* im Archespor der Antheren. Der runde bzw. scheibenförmige Kern enthält außer dem Nukleolus ein dichtes Gewirr von Chromosomenfäden (Abb. 1). Nach den Darstellungen von DARLINGTON (1926), MARQUARDT (1938) und LINDEMANN (1955) sind die Chromosomen von *Bellevia* überwiegend euchromatisch; lediglich die Satelliten sind heterochromatisch. Wir beziehen uns zunächst allein auf die angeblich euchromatischen Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte. Die dünnen Chromosomenfäden

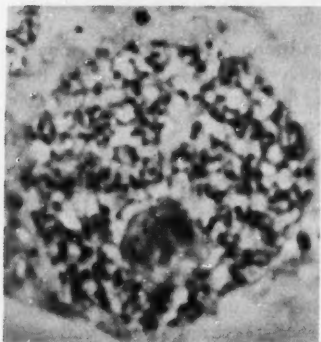


Abb. 1

Abb. 1. Unbeschädigter prämeiotischer Ruhekern. Chromosomen in lockeren Schleifen und Spiralen. Färbe- und Dickenunterschiede im Chromosom nicht feststellbar. (Flemming-Heitz; Orcein; Phako 2000:1)

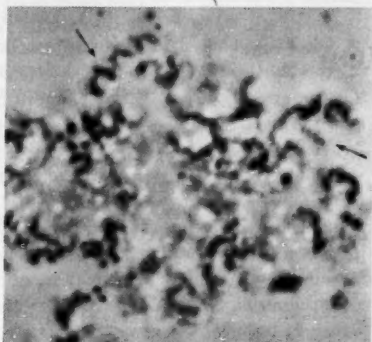


Abb. 2

Abb. 2. Stück eines stark gequetschten Ruhekerns; die Kernmembran ist geplatzt, und die Chromosomen sind frei geworden. Es sind Chromosomenspiralen verschiedener Art und verschiedenen Ausmaßes zu erkennen. (Flemming-Heitz; Orcein; Phako 2000:1)

sind ziemlich einheitlich gefärbt, ebensowenig zeigen sich Dickenunterschiede. In mit Osmium-Chromsäure fixierten und schwach gequetschten Kernen zeigen sich die Fäden keineswegs als völlig gestreckt und entspiralisiert, vielmehr liegen sie in *lockeren Schleifen* und *Spiralen* verschiedenen und wechselnden Ausmaßes im Kernraum. Vielfach findet sich auch eine gleichmäßige Spiralisierung von sehr geringem Spiraldurchmesser (Abb. 2).

Der Beginn der *meiotischen Prophase* zeigt sich insbesondere durch eine merkliche Zunahme des Kernvolumens an (Abb. 3). Gleichzeitig strecken sich die dünnen Chromosomenfäden, um im nachfolgenden Leptotänstadium ihre offensichtlich maximale Streckung zu erfahren (Abb. 4). Von diesem Stadium ab lassen sich die Kerne viel leichter quetschen, so daß nun auch die Morphologie ihrer Chromosomen zu-

gänglicher wird. Am frischen Präparat fällt sofort die ungleiche Anfärbung der Chromosomen auf; *es wechseln hellere und dunklere Regionen verschiedenen Längenausmaßes miteinander ab*, wobei die helleren Regionen dünner erscheinen. Die dunkleren Regionen sind sehr wohl bei mikroskopischer Betrachtung von den Fehlern zu unterscheiden, die durch Lagerung von Fäden bzw. Schleifen parallel zur Lichtrichtung zustande kommen (optische Querschnitte) (Abb. 4). Dieses gestreckte Stadium ist seinem Zeitablauf nach sehr kurz, denn bald setzt eine erneute Spiralisierung ein. Dabei umfassen die Spiralwindungen sowohl die dunkleren als auch die helleren Strukturen des Chromosoms. Infolgedessen erscheinen selbst in einem so frühen Stadium manche nunmehr aufspiralisierte dunklere Fadenstücke rund bzw. kugelig. *Ebenso ist in diesem Stadium bereits ein Längsspalt sichtbar* (Abb. 5). Im weiteren Verlauf der meiotischen Prophase verstärkt sich die Spiralisierung; sie ist nunmehr in sämtlichen Chromosomenabschnitten deutlich sichtbar (Abb. 6 a). Insbesondere Abb. 6b gibt spiralisierte Leptotänchromosomen

wieder, wobei man deutlich die durch die Spirale umgebogenen dickeren und gleichzeitig dunkleren Chromosomenabschnitte erkennt. Die helleren Regionen sind ebenfalls spiralisiert: deren Spiralisierung erscheint schwächer und lockerer. Besonders klar erkennt man in dem in Abb. 6c dargestellten Fadenstück, das zwar aus dem gleichen Kern stammt, dennoch gewissermaßen ein etwas späteres Stadium zeigt als das in Abb. 6b gegebene, wie durch Spiralisierung der dickeren und stärker gefärbten Segmente der Eindruck von runden, kugeligen bzw. länglichen Gebilden zustande kommt.

In diesem immerhin schon hochspiralisierten Zustand setzt die Homologenpaarung ein; *das Zygotän kündigt sich an*. Zu Beginn der Paarung führt eine geringe Fixierungsstabilität zu Verklebungen der Chromosomenfäden. Mit zunehmender Paarung nimmt auch die Spiralisierung zu (Abb. 7). Und zwar handelt es sich zunächst um eine recht lockere Anlagerung der homologen Chromosomen. Im Vergleich mit dem

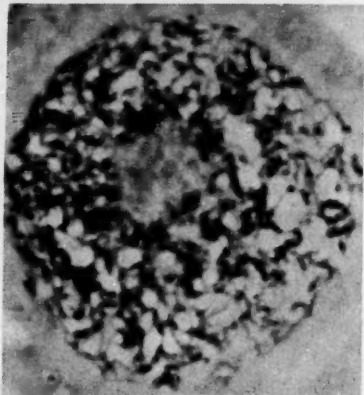


Abb. 3. Beginn der meiotischen Prophase. Das Kernvolumen hat zugenommen. Die Chromosomenfäden erscheinen gestreckter. (Orcein-Carnoy; Phako 3000:1)

Leptotän hat sich die Färbbarkeit der dunkleren und nunmehr im Durchmesser mächtigeren Chromosomenabschnitte weiter erhöht.

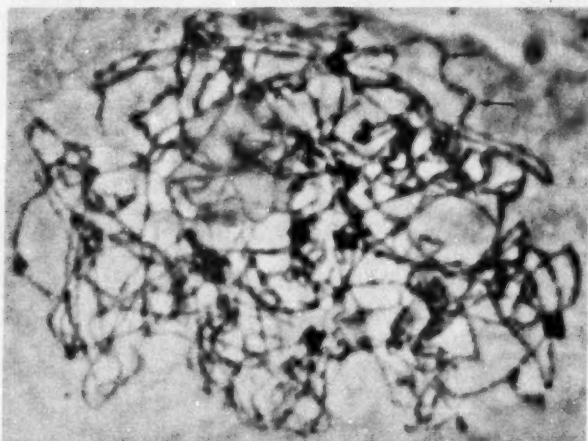


Abb. 4. Frühes Leptotänstadium. Chromosomen offensichtlich maximal gestreckt. Im Chromosom sind hellere und dunklere Regionen verschiedenen Ausmaßes unterscheidbar (Orcein-Carnoy; Phako 2000:1)

Die Abb. 8a zeigt eine kaum gequetschte Zelle im *Pachytän*stadium. In Abb. 8b wird ein Teil davon im gleichen Vergrößerungsmaßstab wie

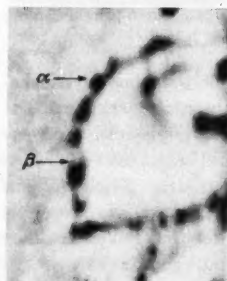


Abb. 5. Späteres Leptotän. Chromosom mit beginnender Spiralisierung (α); an einer Stelle (β) ist die Doppelnatur des Chromosomenfadens erkennbar. (Orcein-Carnoy; Phako 4000:1)

die meisten übrigen Abbildungen (2000:1) wiedergegeben. Der Durchmesser eines Chromosomenpaares ist gegenüber Abb. 7 durchweg doppelt so groß. Gleichzeitig wurden die Chromosomen als kontrahierte Gebilde durch die Aufspiralisierung ungemein verkürzt, wobei man durchaus annehmen kann, daß die wahre Chromosomenlänge die gleiche bleibt. Vergleicht man das späte Leptotän mit dem Pachytän (Abb. 5, 8), so kann man eine Zunahme des Spiraldurchmessers und eine Abnahme der Ganghöhe feststellen; infolgedessen sind nunmehr die Chromosomen dicker. Diese scheinbare Chromosomenverkürzung erreicht schätzungsweise einen Wert von etwa $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{6}$ des frühen Leptotäns. Dabei ist bemerkenswert, daß diese Aufspiralisierung weder in allen Chromosomen eines Kernes, noch in denen benachbarter Kerne mit gleichem Verkürzungserfolg abläuft. So betrug

sierung weder in allen Chromosomen eines Kernes, noch in denen benachbarter Kerne mit gleichem Verkürzungserfolg abläuft. So betrug

in zwei benachbarten Kernen kaum gequetschter Zellen die Genomlänge des einen Kernes das 1,5fache des anderen. Die Verkürzung und Verdickung der Pachytänfäden hat außerdem noch eine Änderung des

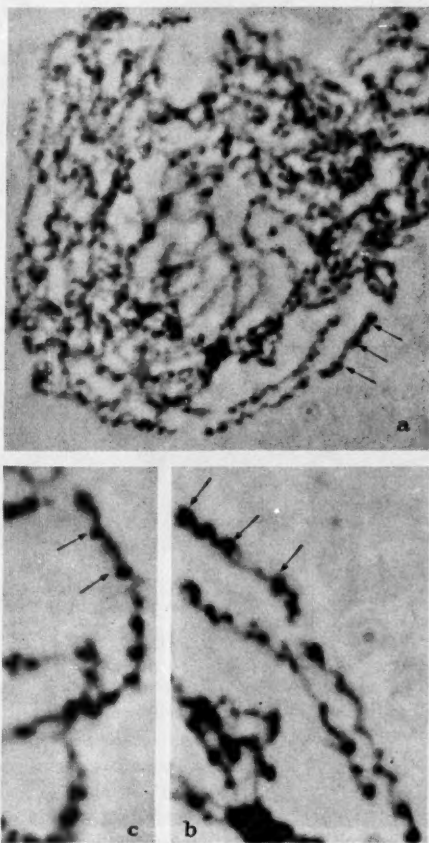


Abb. 6a—c. Spätes Leptotän. Die ungepaarten Chromosomenfäden sind hochspiralisiert; deren dunklere Anteile sind jetzt stärker ausgeprägt (a und b). c kugelige Gebilde entstanden durch entsprechende Spiralisierung der dunkleren Segmente. (Orcein-Carnoy; Phako a 2000:1, b und c 4000:1)

allgemeinen Gesamteindruckes der Chromosomen zur Folge. Durch die Zunahme des Spiraldurchmessers wird das kugelige Aussehen der umgebogenen dickeren und stärker gefärbten Chromosomensegmente

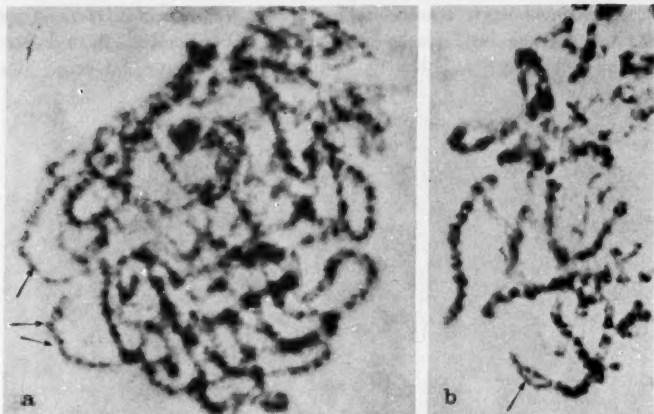


Abb. 7a u. b. Spätes Zygotän. Die Masse der Chromosomen bereits gepaart. Bei a Umschlingungen, bei b ungepaarte Chromosomen. (Orcein-Carnoy; Phako 2000:1)

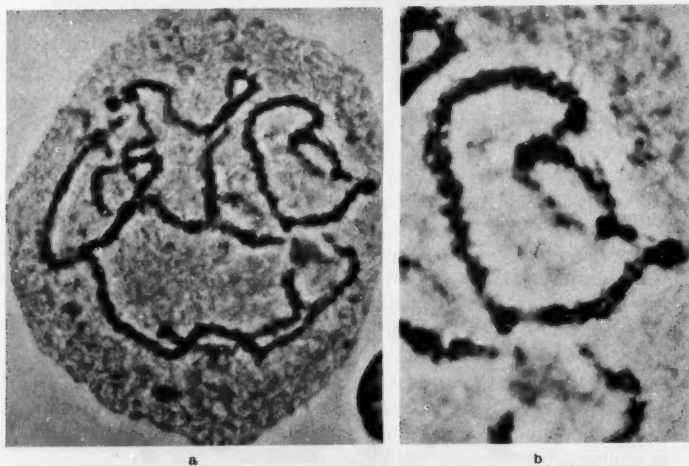


Abb. 8a u. b. Spätes Pachytän. Durch Präparation unverändert gebliebene Chromosomen. Ausschnitt b zeigt die verwirrend enge Spiralisierung. Keine besonders auffallenden Strukturen. (Orcein-Carnoy; Phako a 1000:1, b 2000:1)

gemindert; die enge Packung der Spiralen und das streckenweise Umwinden der Chromosomenfäden sowie die nun häufiger auftretenden optischen Überlagerungseffekte ergeben dann bei denjenigen

Chromosomen, die durch die Präparation nur unwesentlich verändert sind, die Gesamtinktion eines tieferen Grau, als das bei den euchromatischen Enden partiell heterochromatischer Chromosomen der Fall ist. Das ist inzwischen für eine Reihe von Objekten mit anscheinend total euchromatischen Chromosomen bekannt geworden (vgl. GORTSCHALK 1954, S. 582 u. 583 und LINNERT 1955, S. 98). — Soweit es sich dabei um optische Täuscheffekte handelt, erscheinen solche vorwiegend

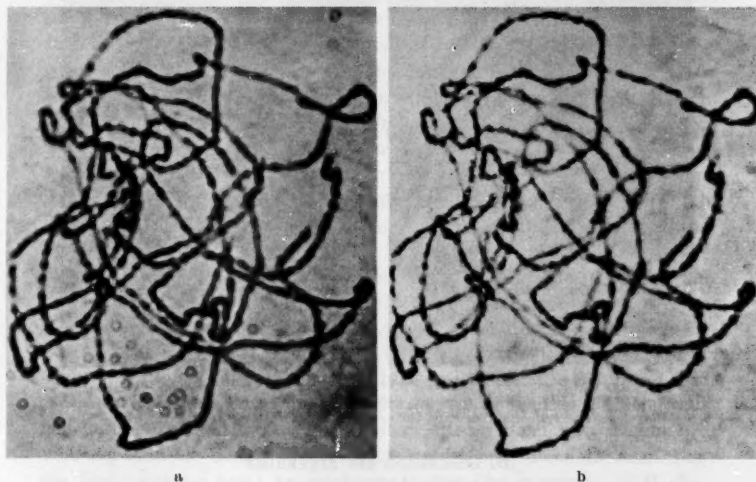


Abb. 9a u. b. Vergleichsaufnahme mit (a) Apo 100 \times und (b) Phako 100 \times desselben Kernes. Chromosomen durch Präparation etwas gestreckt. (Orcein-Carnoy; a und b 1000:1)

im normalen Lichtmikroskop bei schwach gequetschten Präparaten. Den Leistungsunterschied zwischen gewöhnlicher Licht- und Phasenkontrast-Mikroskopie demonstrieren die Abb. 9a und b, in denen der Kern abgesehen davon stärker gequetscht ist.

Die Spirale im Pachytän ist eine Anorthospirale; die Chromosomen waren bereits vor der Paarung hochspiralisiert und umwinden sich nicht wesentlich. Im späten Leptotän besonders sind auch Richtungsänderungen in den Spiralwindungen zu erkennen. Sofern man die hochspiralisierten Chromosomen weitgehend streckt, erhält man einen genaueren Einblick in ihren Bau auch im Pachytän. In einigen Fällen gelingt das. Abb. 10 zeigt solche Chromosomen, photographiert mit Apo 100 \times und Phako 100 \times . Durch die Dehnung der Chromosomen ist die Anorthospirale aufgehoben worden, die Fäden sind gestreckt wie im frühen Leptotän. Während der Chromosomenlängsspalt hier

kaum sichtbar ist, läßt sich gegenüber dem Leptotän eine deutliche Zunahme des Chromosomendurchmessers auf etwa das Doppelte konstatieren (vgl. Abb. 4 mit Abb. 10). Das Phako-Bild zeigt kleinere Höfe um die Chromosomen und ist insgesamt ruhiger; dagegen würde auf dem Apo-Bild die unscharfe Begrenzung der dicken und dunkler gefärbten Chromosomenabschnitte eine geringere Spiralisation vermuten lassen.

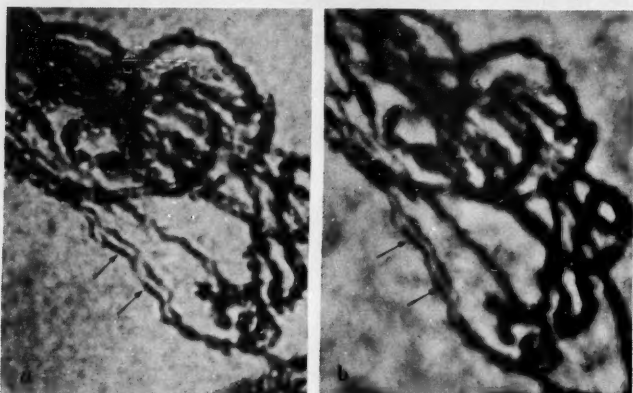


Abb. 10a u. b. Durch starkes Quetschen gestreckte Pachytänchromosomen (a Apo 100 \times , b Phako 100 \times). Die lokalen dunkler gefärbten Verdickungen im Chromosom haben gegenüber dem Leptotän eine deutliche Größenzunahme erfahren. (Orcein-Carnoy; 2000:1)

D. Diskussion der Ergebnisse

1. Die Spiralisation der Chromosomen

Bei der Untersuchung des prämeiotischen Ruhekerns erhielten wir dasselbe Ergebnis wie STRAUB (1938). Die Chromosomen zeigen von der letzten mitotischen Telophase her Restspiralen, welche einen mehr oder weniger unregelmäßigen Zickzackverlauf besitzen; vielfach fanden wir auf größere Strecken hinweg Spiralen gleicher Ganghöhe (Abb. 1, 2). Ebenso decken sich unsere Befunde mit denen von NEBEL und RUTTLE (1936), welche im frühen Leptotän bei *Tradescantia*, *Trillium* und anderen Objekten gestreckte Chromosomen vorfanden (Abb. 4). Bei *Bellevallia* beginnt bereits im Leptotän die erneute Spiralisation, welche als feine Wellung der Chromosomen erkennbar ist und sich im Laufe des Leptotäns deutlich steigert. Sie umfaßt sowohl die dunkleren als auch die hellen Chromosomensegmente (s. a. SCHERZ 1956).

Im spiralisierten Leptotän konnten wir einen Längsspalt im Chromosom sehen und abbilden (Abb. 5). Es ist anzunehmen, daß die Doppelnatur der Chromosomen auch später noch gegeben ist, durch die verwendete Präparationstechnik deshalb jedoch nicht mehr sichtbar blieb,

weil die Empfindlichkeit gegenüber dem Fixierungsmittel in späteren Stadien etwas zunimmt (vgl. S. 353). Jedenfalls paaren sich die Chromosomen in sichtlich hochspiralisiertem Zustand (Abb. 7). Es muß sich also Spiralwindung an Spiralwindung legen, d. h., beide Chromosomen liegen im Pachytän als Anorthospirale vor. — Bereits SAX (1930), ISHII (1931) und NEBEL (1932) beschreiben für homologe Chromosomen eine gleiche Anzahl von Spiralwindungen. Dies bestätigt auch SCHERZ (1956). Der Meinung von SAX (1935) und STRAUB (1938, S. 112), daß die Chromosomen sich im gestreckten Zustande paaren, können wir uns für *Bellevalia* nicht anschließen. Auch halten wir es nicht für sehr wahrscheinlich, daß der gestreckte Zustand der Chromosomen der geeignetste für die Paarung sei. Vielmehr könnte man sich vorstellen, daß durch den spiralisierten Zustand vor der Paarung eine Orthospirale vermieden wird. *So muß durch den bei Bellevalia gegebenen Modus eine Anorthospirale zustande kommen*, wobei die freie Trennbarkeit der Chromosomen in der Anaphase I schon von vornherein gewährleistet wird. Demnach kann das Pachytän nicht das Stadium maximaler Entspiralisierung und Streckung sein, wie I. und K. SAX (1935) sowie STRAUB (1938, S. 37) infolge der damals noch verwendeten Technik annehmen mußten, sondern es liegen bereits hochspiralisierte Chromosomen vor (GOTTSCALK 1954, LINNERT 1955, EBERLE 1956, SCHERZ 1956 u. a.). So bedürfen auch einige weitere Ansichten wie die des relational coiling und der Chiasmenbildung einer Revision (Literatur bei STRAUB 1938). Es sind zwar die meiotischen Prophasechromosomen in frühen Stadien weitgehender entspiralisiert als die in der Mitose; doch mit Beginn der Paarung sind sie bereits wieder hoch spiralisiert. Deshalb kann man die Nichtpaarung total heterochromatischer Chromosomen (z. B. Geschlechtschromosomen bei *Sphaerocarpus*) wohl kaum auf deren spiralisierten Zustand zurückführen (STRAUB 1938, S. 119). Und ebensowenig kann der gestreckte Zustand der Chromosomen die Ursache für eine Paarung sein.

Die Spiralisierung nimmt im Verlaufe des Pachytäns noch weiter zu. Da sie bei *Bellevalia* über die ganzen Chromosomen hinweg gleichmäßig auftritt, muß sie auch durch eine gleichmäßige innere oder äußere Ursache bedingt sein. Die Windungen legen sich im späten Pachytän derart eng aneinander (Zunahme des Spiraldurchmessers, Abnahme der Ganghöhe!), daß sie das Bild eines relativ dicken Fadens bieten, der sich an einigen Stellen als aus 4 Längselementen zusammengesetzt erkennen läßt. Wir schätzen die Chromosomenverkürzung im Pachytän auf $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{6}$ des frühen Leptotäns und führen die geringere Verkürzung „total euchromatischer“ Chromosomen gegenüber den euchromatischen Segmenten partiell-heterochromatischer Chromosomen vom Pachytän bis zur Metaphase auf die eben bereits früher erfolgte höhere Verkürzung zurück (s. OEHLKERS 1944, EBERLE, Diss. 1955).

2. Die Struktur der Chromosomen

Bellevalia ist bis auf die Satelliten ein Objekt mit anscheinend total euchromatischen Chromosomen. Es fehlen also die bei anderen Objekten mit partiell heterochromatischen Chromosomen vorhandenen heterochromatischen Mittel- oder Endstücke. Nun hat sich als besonders auffällig bei allen solchen Formen erwiesen, daß die Färbung der Chromosomen im Pachytän eine tiefere ist als das bei den euchromatischen Endstücken der Chromosomen partiell heterochromatischer Objekte der Fall ist (vgl. S. 357). Ebenso sind die Chromosomen in euchromatischen Ruhekernen stärker anfärbbar als die euchromatischen Segmente partiell-heterochromatischer Objekte. Infolgedessen haben wir uns schon längst die Annahme gebildet, daß das vermutlich bei diesen euchromatischen Objekten auch vorhandene Heterochromatin mehr oder weniger diffus verteilt sein müßte. Nur ließ sich bisher noch kein realer Anhaltspunkt dafür finden. Wie vorhin gezeigt, ergibt sich in unseren Bildern eine Gliederung des Chromosomenfadens im frühen Leptotän, in welchem es vollkommen gestreckt ist, in etwas längere stärker färbare Abschnitte, verbunden durch solche schwächerer Tinktionsfähigkeit. *Wir stehen nicht an, diese Gliederung als eine solche in Hetero- und Euchromatin anzusehen*, wobei wir natürlich nicht außer acht lassen dürfen, daß die Definition dessen, was man mit Heterochromatin bezeichnen kann, eine nach und nach reichlich schwankende wird. Jedenfalls finden wir eine weitere Struktureigentümlichkeit heterochromatischer Chromosomenteile auch bei den Chromosomen von *Bellevalia*, nämlich die relativ frühe Spiralisierung, die man ja sonst bekanntlich immer als ein besonderes Merkmal heterochromatischer Partien partiell heterochromatischer Chromosomen angesehen hat. Infolgedessen ergibt sich auch eine relativ gleichmäßige Aufspiralisierung der ganzen Chromosomen, weil die heterochromatischen Partien ziemlich gleichmäßig über die ganze Länge verteilt sind. Danach dürfte es wahrscheinlich sein, daß es Objekte mit total euchromatischen Chromosomen überhaupt nicht gibt. Denn da den heterochromatischen Partien eine besondere genetische Funktion zugeschrieben wird, müßte diese ja sonst bei den euchromatischen ausfallen.

3. Die Chromomeren

Nach Erörterung dieser Zusammenhänge können wir nun auch eine Aussage über die Natur der sog. Chromomeren machen. Sehr vielfach werden die Chromosomen als ein perlschnurartiges Gebilde von einzelnen Chromomeren angesehen, die durch Fibrillen miteinander verbunden sind. Daß das für unser Objekt nicht zutrifft, dürfte nach den gegebenen Bildern nicht mehr zu bezweifeln sein. Es liegt diese Meinung offenbar daran, daß man einzelne Stadien, so etwa wie unsere Abb. 5, vielfach

als typischen Chromosomenbau herausgesucht hat (vgl. BELLING 1931). Wir konnten aber für *Bellevalia* zeigen, daß dieser Zustand ein ganz und gar vorübergehender ist, der allein dadurch zustande kommt, daß die heterochromatischen und euchromatischen Partien des frühen Leptotänchromosoms verschiedene Spiralwindungen zeigen und somit die dickeren Partien in Form von kugeligen oder länglichen Gebilden durch dünnere Partien getrennt sind. Daß man selbstverständlich in partiell heterochromatischen Chromosomen, bei denen das Heterochromatin in größeren Stücken verteilt ist, Makro- und Mikrochromomeren unterscheiden kann, ergibt sich nach dem bisher Aufgezeigten von selbst. Jedenfalls dürfte mit dieser Arbeit gezeigt sein, daß man bei der Abgrenzung einzelner Chromomeren niemals das Phänomen der Spiralisierung außer acht lassen darf (vgl. LIMA-DE-FARIA 1952).

4. Chromosomenwachstum

Ohne Zweifel sind die Chromosomen des Pachytäns dicker gegenüber jenen des Leptotäns (Abb. 4 und 10). Insbesondere stellen wir eine Größenzunahme der dunkleren Segmente auf etwa das Doppelte fest. Inwieweit auch in linearer Richtung der Chromosomen eine Veränderung auftritt, ist bis jetzt noch nicht nachweisbar. Die Anfärbbarkeit der Chromosomen ist zwar sehr vom pH -Wert abhängig (YAMAHA 1935), und dieser ändert sich im Laufe der Prophase; doch wird davon nicht die Größe der Strukturen betroffen. Wir halten die Veränderungen auf den Chromosomen für reale DNS-Aufladungen und sehen eine Stütze dieser Ansicht in den Untersuchungen von MOSES und TAYLOR (1955) in der meiotischen Prophase von *Tradescantia*. Nach deren Methoden der Cytophotometrie und Autoradiographie wird während des Leptotäns eine beträchtliche Menge von P^{32} in die DNS eingebaut. Wir wiederum fanden bei feulgengefärbten Pachytänchromosomen, welche infolge der Osmiumsäurehärtung nur schwach gequetscht werden konnten, über ihre ganzen Längen hinweg eine starke Rotfärbung. So muß es sich wohl bei den Chromosomenverdickungen im wesentlichen um eine DNS-Zunahme handeln.

Zusammenfassung

1. Die Chromosomen des prämeiotischen Ruhekerns von *Bellevalia romana* besitzen Spiralen verschiedenen Durchmessers und verschiedener Ganghöhe. Im frühen Leptotän sind die Chromosomen maximal gestreckt. Die Spiralisierung beginnt mit einer feinen Wellung und steigert sich zu deutlichen Spiralen im späten Leptotän. Bis zum Pachytän erfolgt eine weitere Zunahme des Spiraldurchmessers; die Ganghöhe nimmt ab.

2. Die Chromosomen paaren im hochspiralisierten Zustande, so daß im Pachytän die Chromosomenpaare als eine Anorthospirale vorliegen

und somit gleichzeitig ihre freie Trennbarkeit in der Anaphase gewährleistet wird. Die scheinbare Chromosomenverkürzung vom Leptotän bis zum Pachytän, bedingt durch die Spiralisation, wird auf $\frac{1}{4}-\frac{1}{6}$ geschätzt.

3. Der frühe Leptotänchromosomenfaden ist in stärker färbbare Abschnitte gegliedert, verbunden durch solche von schwächerer Tinktionsfähigkeit. Diese Gliederung wird als eine solche in Hetero- und Euchromatin angesehen. Die frühe und gleichmäßige Spiralisation der Leptotänchromosomen wird auf die relativ gleichmäßige Verteilung heterochromatischer Segmente zurückgeführt. Die starke Anfärbbarkeit der Ruhekerne solcher angeblich rein euchromatischer Objekte wird durch deren dennoch vorhandene heterochromatischen Segmente veranlaßt.

4. Die spiralisierten Leptotänchromosomen zeigen einen deutlichen Längsspalt.

5. Durch die starke Spiralisation im Leptotän entsteht insbesondere in den dunklen Segmenten das Bild kugeliger bis länglicher Gebilde, welche man Chromomeren nennen kann. Chromomeren und Spiralen sind also nur auf gewisse Stadien beschränkte Erscheinungsbilder, welche jedoch eine bestimmte reale Chromosomenstruktur als Grundlage haben.

6. Die Dickenzunahme der Chromosomen vom Leptotän bis zum Pachytän, insbesondere in den stärker anfärbbaren Segmenten, ist sehr wahrscheinlich durch eine DNS-Aufladung bedingt.

Literatur

- BELLING, J.: Chromomeres of liliaceous plants. Univ. California Publ. Bot. 16, 153—170 (1931). — CAMARA, A. DE SOUZA DA: Beiträge zur Kenntnis des Spiralbaus der Chromosomen. Z. Vererbungslehre 74, 202—215 (1938). — DARLINGTON, D. C.: Chromosome studies in the *Scilleae*. J. Genet. 16, 237—251 (1926). — EBERLE, P.: Vergleichende Cytologie der Gesneriaceen unter besonderer Berücksichtigung der Morphologie der Pachytänchromosomen. Diss. Freiburg i. Br. 1955. Zytologische Untersuchungen an Gesneriaceen I. Die Struktur der Pachytänchromosomen sowie eine Reihe neu bestimmter Chromosomenzahlen. Chromosoma 8, 285—316 (1956). — GEITLER, L.: Chromosomenbau. Protoplasma Monogr. 14 (1938). — GOTTSCALK, W.: Die Chromosomenstruktur der Solanaceen unter Berücksichtigung phylogenetischer Fragestellungen. Chromosoma 6, 539—626 (1954). — HUSKINS, C. L.: The internal structure of chromosomes. A statement of opinion. Cytologia Fujii-Jub.-Bd. 1937, 1015—1022. — KUWADA, Y.: Chromosome structure. A critical review. Cytologia 10, 213—256 (1939). — LIMA-DE-FARIA, A.: Chromomere analysis of the chromosome complement of rye. Chromosoma 5, 1—68 (1953). — LINDEMANN, R.: Vergleichende cytologische Untersuchungen an den Liliaceen *Bellevalia romana*, *Agapanthus umbellatus* und *Lilium regale*. Diss. Freiburg i. Br. 1955. — LINNERT-G.: Die Struktur der Pachytänchromosomen in Eu- und Heterochromatin und ihre Auswirkung auf die Chiasmabildung bei *Salvia*-Arten. Chromosoma 7, 90—128 (1955). — MANTON, I.: The spiral structure of chromosomes.

Biol. Rev. 25, 486—508 (1950). — MARQUARDT, H.: Die Röntgenpathologie der Mitose I, II. Z. Bot. 32, 401—482 (1938). — MATSUURA, H.: On the number of spiral gyres in the chromonemata. Jap. J. Genet. 9 (1934). Zit. nach STRAUB 1938. — MOSES, M. J., and J. H. TAYLOR: Desoxyribose nucleic acid during microsporogenesis in *Tradescantia*. Exper. Cell. Res. 9, 474—488 (1955). — NEBEL, B. R.: Chromosome structure in *Tradescantia*. I. Methods and morphology. Z. Zellforsch. 16, 251—284 (1932). — NEBEL, B. R., and M. L. RUTTLE: Chromosome structure in *Tradescantia* VII. Further observations on the direction of coiling in *Tradescantia reflexa* and *Trillium erectum*. Amer. J. Bot. 23, 652—663 (1936). — OEHLKERS, F.: Cytologische und cytogenetische Untersuchungen an *Streptocarpus*. Z. Bot. 39, 113—153 (1944). — RUCH, F.: Über den Schraubengang der meiotischen Chromosomen. Chromosoma 3, 357—392 (1950). — RUTTLE, M. L., and B. R. NEBEL: Chromosome structure. XI. *Hordeum vulgare* L. and *Secale cereale* L. Cytologia, Fujii-Jub.-Bd. 1937, 553—568. — SAX, K.: Chromosome structure in the meiotic chromosomes of *Rhoeo discolor* HANCE. J. Arnold Arb. 16, 216—224 (1935). — SCHERZ, CH.: Über die Chromosomenstruktur in der meiotischen Prophase einiger Compositen. Diss. Freiburg i. Br. 1956. — STRAUB, J.: Neuere karyologische Probleme und Ergebnisse. IV. Die Spiralstruktur der Chromosomen. Sammelreferat. Z. Bot. 33, 65—126 (1938). — YAMAHA, G.: Über die P_{H_1} -Schwankungen in der sich teilenden Pollenmutterzelle einiger Pflanzen. Cytologia 6, 523—526 (1934/35).

Professor Dr. FRIEDRICH OEHLKERS,
Botanisches Institut der Universität, Freiburg i. Br.

From the Botany Department, University of Oxford

CORRELATED CHROMOSOME ABERRATIONS AT MEIOSIS IN GASTERIA

By

C. D. DARLINGTON and M. KEFALLINOU*

With 5 Figures in the text

(Eingegangen am 20. Juni 1956)

Plants of a clone long cultivated in the Oxford Botanic Garden and labelled *Gasteria undulata* flowered in the cool glasshouse in April 1954 and 1955. They regularly showed a group of abnormalities at meiosis in the pollen mother cells. These have been studied in order to discover their origin, their relations and their effects. Aceto-carmin squashes

were used for meiosis, Feulgen squashes for mitosis.

At mitosis in *Gasteria* there are four pairs of long chromosomes, two with secondary presumably nucleolar constrictions, and three pairs of short chromosomes (Fig. 1).

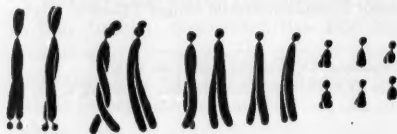


Fig. 1. Mitotic complement of *Gasteria undulata*.
All figures $\times 1600$

At first metaphase of meiosis pairing is regular. As Table 1 shows the short bivalents have only slightly fewer chiasmata than the long ones, without however any obvious localisation: the *Chorthippus* type of length-frequency relation.

Table 1. *Chiasma frequencies of long and short bivalents, and of long and short arms of long bivalents in 20 pollen mother cells. Total: 315 chiasmata.*

Total bivalents	4 long bivalents (14.2 μ)				3 short bivalents (3.5 μ)			
	Total chiasmata	chiasmata per bivalent	Terminal chiasmata	Terminal chiasmata per bivalent	Total chiasmata	chiasmata per bivalent	Terminal chiasmata	Terminal chiasmata per bivalent
80+60	203	2.53	61	0.76	112	1.90	107	1.78
4 long bivalents								
80	Long Arm (12.2 μ)				Short Arm (2 μ)			
	Total chiasmata	chiasmata per bivalent	Terminal chiasmata	Terminal chiasmata per bivalent	Total chiasmata	chiasmata per bivalent	Terminal chiasmata	Terminal chiasmata per bivalent
80	130	1.62	8	0.10	73	0.91	53	0.66

* Now M. HATTERSLEY-SMITH, Ottawa.

Table 2. *Errors of chromatid separation and centromere behaviour at first anaphase in 261 cells. (Md. = Misdivision of one chromatid pair)*

No. of cells		Chromatid errors			Centric errors			
		Bridges due to intercalary or terminal attachment of chromatids			Precocious division of one bivalent to 4 chromatids		Precocious division of two bivalents to 8 chromatids	
Total	Abnormal	1	2	3	NoMd.	Md.	NoMd.	Md.
261	101	36*	9	3	32*	20	2	1
Totals		48			55			

* Two of these cells duplicated since they show one bridge and one centric error.

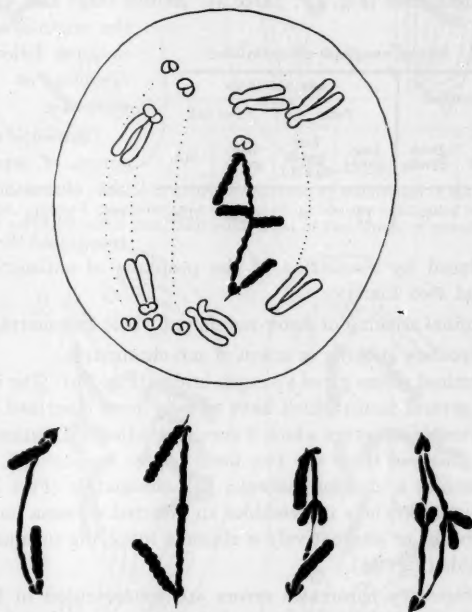


Fig. 2. Chromatid errors at first anaphase in a complete cell and in four isolated bivalents: single terminal (b), single intercalary (c, d) and double intercalary (e)

At first anaphase one third of the cells show abnormalities. These are of two kinds: centric errors and chromatid errors; both of them are confined to the four long pairs (Table 2).

Centric errors. The errors of division of the centromere have the general character and consequences of misdivision as described in *Frithillaria kamschatkensis* (DARLINGTON 1939). The course of events is

however somewhat simpler. In spite of the complete pairing seen at metaphase, pairs of single chromosomes are seen lagging and dividing at anaphase, some of them also misdividing.

What has happened is evidently the following. The co-orientated bivalent collapses owing perhaps to a delay in co-orientation. The centromeres of the two single chromosomes may then auto-orientate and divide to give four chromatids. Either before, or (in contrast to *Fritillaria*) after, this division the centromeres cease to move to the poles and begin to misdivide. And, if after, only in one or two of the four chromatids (Fig. 3a). Indeed misdivision may be partly or entirely postponed to the second anaphase (Fig. 3b; Table 3). At this stage also we may see

the origin of an isochromosome following misdivision at the first anaphase.

Chromatid errors. The errors of separation of the chromatids are of the kinds now well recognised through their

Table 3. *Second anaphase abnormalities*

Total no. of cells	Abnormal		Abnormalities			
			Total		Per cell	
	One dyad	Both dyads	Lag-gards	Lag-gards and Md.	Lag-gards	Md.
64	8	6	11	6	0.26	0.09

being produced by irradiation of the prophase of mitosis or meiosis. They are of two kinds:

- (1) terminal sticking or sister-reunion of whole chromatids.
- (2) intercalary sticking or union of sub-chromatids.

The terminal union gives a simple bridge (Fig. 2b). The intercalary union has several forms which have already been described in relation to the polynemic structure which it seems to indicate (DARLINGTON 1949, 1955). In *Gasteria* there are two main types: *symmetrical*, where the union resembles a chiasma between half-chromatids (Figs. 2c and 4a) and *asymmetrical*, where it resembles an inverted chiasma (or a chiasma in an inversion) or alternatively a chiasma involving unequal fractions of chromatids (Fig. 2a).

The intercalary chromatid errors are concentrated in the mid or distal segments of the long arms of the long chromosomes: the same chromosomes that suffer misdivision of the centromere. But, it will be seen, they are confined to parts of chromosomes remote from the centromere.

Correlation of Errors. The occurrence of the centric and chromatid types of error together has not been explicitly recognised before. Chromatid sticking is moreover frequently seen at mitosis — and confined to distal segments — both spontaneously and after low temperature and X-ray treatments (DARLINGTON and LA COUR 1940, on *Trillium*: and

REES 1953, on *Scilla*). In the light of our present knowledge however we may assume widespread correlation at meiosis. The original account of spontaneous misdivision illustrated chromatid sticking without special

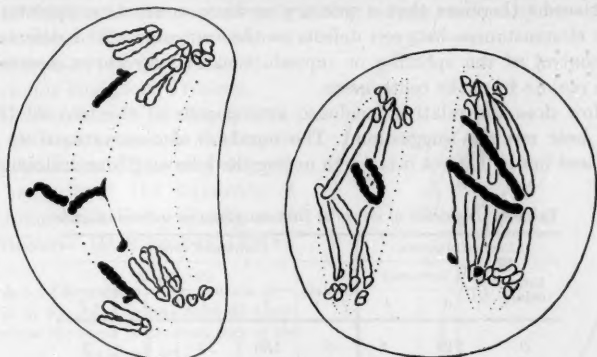


Fig. 3. First anaphase: collapse of a bivalent followed by misdivision of the centromere in one chromatid. Second anaphase: non-division of an already misdivided long telocentric to form an iso-chromosome (left) and misdivision of two daughter univalents (right)

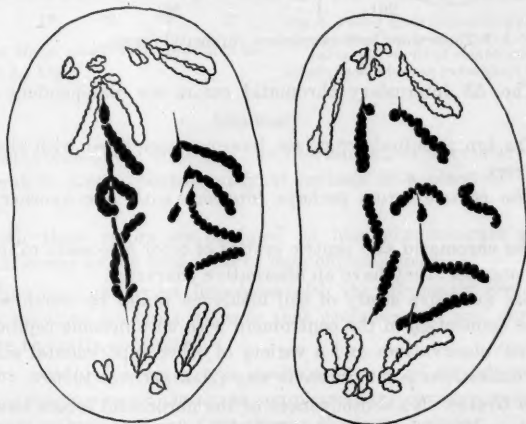


Fig. 4. First anaphases showing the combination of centric and chromatid errors (4a) and of centric errors in two bivalents giving immediate misdivision in one of the eight chromatids, lagging in three, and normal movement in four (4b)

comment in the same cell sample (1939, Fig. 3c, d, e). Probably the same concurrence is to be inferred from KLINGSTEDT's (1939) illustrations of meiosis in a *Chorthippus* hybrid. The same is true of MARQUARDT's (1952) account of *Paconia tenuifolia* and HAGA's (1953) account of *Paris*

verticillata. These are spontaneous occurrences. They are again together, but combined with other errors as well, in the effects of mustard gas treatment (DARLINGTON and KOLLER 1947).

It seems therefore that a primary or basic connection operates in some circumstances between defects in the centromere and defects in the control of the splitting or reproduction of long chromosomes in parts remote from the centromere.

How does the relative incidence among cells of the two kinds of error bear out this suggestion? The numbers of observations are insufficient but in Table 4 it is worth noting the following four indications:

Table 4. *Incidence of errors at first anaphase in individual cells*

Chromatid errors			Combined errors				
Inter-calary	Terminal		Centric	Chromatid			
	0	1		0	1	2	3
0	213	4	0	180	34	9	3
1	32	3	1	50	2*	—	—
2	6	3	2	3	—	—	—
Total	251	10		213	36	9	3
	261			261			

* These were both *intercalary* chromatid errors.

(1) The 53 intercalary chromatid errors are independent of one another.

(2) The ten terminal errors are however correlated with the intercalary errors.

(3) The centric errors perhaps interfere with one another within the cell.

(4) The chromatid and centric groups of error also seem to interfere with one another: they have an alternative character.

A more extensive study of cell incidence would be worth while to verify the connection of the centromere with chromosome reproduction since REES' observations and a variety of other experimental and comparative indications point the same way (DARLINGTON 1956b).

Pollen Grains. No consequences of the chromatid errors have been seen at the pollen grain mitosis. But the centric errors lead to the expected result: the formation of pollen grains, eleven with extra L chromosomes, and one with telocentric fragments from the misdivision of L chromosomes (Table 5 and Fig. 5).

The survival of telocentric fragments in the pollen grains has not previously been seen in diploid plants. It opens the way for the three types of evolution of which such fragments seem to be capable:—

(1) Fragmentation hybridity as found in *Spiraea* or increase in basic number as found in *Campanula* (cf. DARLINGTON 1956a).

(2) Reunion in new combinations to give in two stages the same kind of interchanges as can arise directly in one resting nucleus by breakage and reunion. This has been shown by MORRISON (1953, Table 8) in monosomic hexaploid *Triticum*.

(3) Maintenance as supernumerary or B chromosomes floating in the population. This may happen with or without the formation of isochromosomes, as originally seen in *Fritillaria* (DARLINGTON 1956a).

Table 5. *Chromosome complements at mitosis in 91 pollen grains from 25 buds: all contain the three S chromosomes of the standard set*

Chromosomes	3 L	4 L	5 L	6 L
Cells	1*	79	9	2

* Plus three misdivision products of the fourth L: Fig. 5.

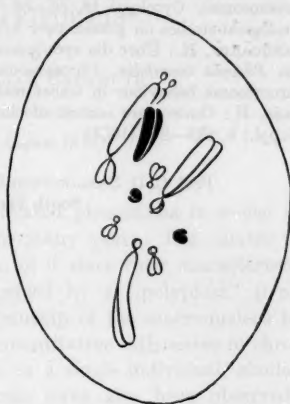


Fig. 5. Pollen grain mitosis in which one L chromosome has been replaced by its two parts, the result of complementary misdivision with one extra short fragment

Summary

1. Misdivision of the centromere and terminal and intercalary unions of chromatids occur spontaneously at meiosis in a plant of *Gasteria undulata*.

2. Both these errors are confined to long chromosomes and the chromatid errors to the long arms of long chromosomes.

3. Thus the centromere interferes with the chromatid errors. Yet this and previous accounts indicate that centric errors and chromatid errors are basically connected.

4. The misdivision gives new isochromosomes at meiosis and new telocentric fragments which act as complementary chromosomes at the pollen grain mitosis and can thus change the basic number.

Bibliography

- DARLINGTON, C. D.: Misdivision and the genetics of the centromere. *J. Genet.* **37**, 341-364 (1939). — The origin of iso-chromosomes. *J. Genet.* **39**, 351-361 (1940). — The working units of heredity. *Hereditas (Lund.) Suppl.* Vol. **1949**, 189-200. — The chromosome as a physico-chemical entity. *Nature* **176**, 139-1144 (1955). — Chromosome botany. London: Allen & Unwin 1956a. — Messages and

movements in the cell. Wageningen University, Symposium on chromosomes. 1956b. — DARLINGTON, C. D., and L. F. LA COUR: Nucleic acid starvation of chromosomes in *Trillium*. *J. Genet.* 40, 185—213 (1940). — DARLINGTON, C. D., and P. C. KOLLER: The chemical breakage of chromosomes. *Heredity* 1, 187—221 (1947). — HAGA, T.: Meiosis in *Paris*. II. Spontaneous breakage and fusion of chromosomes. *Cytologia* 18, 50—66 (1953). — KLINGSTEDT, H.: Taxonomic and cytological studies on grasshopper hybrids (I). *J. Genet.* 37, 389—420 (1939). — MARQUARDT, H.: Über die spontanen Aberrationen in der Anaphase der Meiosis von *Paeonia tenuifolia*. *Chromosoma* 5, 81—112 (1952). — MORRISON, J. W.: Chromosome behaviour in wheat monosomics. *Heredity* 7, 203—217 (1953). — REES, H.: Centromere control of chromosome splitting and breakage. *Heredity* (Suppl.) 6, 235—245 (1953).

Prof. C. D. DARLINGTON, Botany Department, University of Oxford,
South Parks Road, Oxford (England)

From the Department of Zoology, University of California at Berkeley

DIFFERENTIAL MICRONUCLEAR POLYTENY
IN A POPULATION OF THE CILIATE
*TETRAHYMENA PYRIFORMIS**

By

MAX ALFERT and WILLIAM BALAMUTH

With 7 Figures in the text

(Eingegangen am 16. August 1956)

Introduction

The occurrence of polyploidy and related phenomena in nuclei of various protozoans has been known for many years. The ciliates in particular present a striking illustration of it since their characteristic nuclear dualism is commonly accompanied by a "polyploid" (i. e., polyenergic, cf. HARTMANN 1909) relationship of the macronucleus to the micronucleus. In addition to such quantitative differences in chromatin between the two kinds of nuclei in a single individual, similar relationships among different individuals have also been observed: MACDOUGALL (1925) reported the existence of polyploid strains in *Chilodonella* and CHEN (1940a) described several races of *Paramecium bursaria* differing widely in number of micronuclear chromosomes. In the flagellates both polyploid and polytene relationships have been claimed to occur among related varieties of *Holomastigotoidea* studied by CLEVELAND (1949). However, the most clear-cut case of polyteny, in connection with endomitotic polyploidisation, was found by GRELL (1949) during the early growth of the macronucleus in the suctorian, *Ephelota gemmipara*. In the present paper a similar chromosomal condition in holotrichous ciliates is reported, namely, what appears to be an instance of differential micronuclear polyteny in a population of *Tetrahymena pyriformis*.

Materials and Methods

Sexual races of *Tetrahymena pyriformis* have only recently been discovered (ELLIOTT and NANNEY 1952) and at present several mating types are known. The material used in this investigation consisted of cultures of types I and II, variety 1, kindly supplied by Dr. A. M. ELLIOTT approximately two years ago. Since that time stock cultures have been propagated in ELLIOTT's medium (cf. ELLIOTT and

* The authors' work is supported in part by University of California Cancer Funds and by research grant G-4107 (C) from the National Institutes of Health, U. S. Public Health Service. We want to thank Mrs. NORMA O. GOLDSTEIN for technical assistance, and Professor SPENCER BROWN for stimulating critical discussions of this work.

HAYES 1953). As these cultures were used only for instructional purposes, the transfers were made at irregular and often fairly long intervals (3–6 weeks). A series of subcultures of this material (henceforth designated as IB and IIB) was used during the spring of 1955 for a cytochemical study of the nuclei of *Tetrahymena* (ALFERT and GOLDSTEIN 1955). In the course of that work a systematic difference in size and chromatin content between micronuclei of types IB and IIB was observed: Type IB possesses considerably larger nuclei than the other mating type, IIB; moreover, photometric measurements of nuclei stained by the Feulgen procedure revealed an approximate 2:1 relationship in desoxyribonucleic acid (DNA) content between these micronuclei.

In order to ascertain the stability of this micronuclear difference and to determine its nature more closely, a study of conjugation between members of these strains and of the exconjugants has now been made.

Cultures of IB and IIB were starved for three days in distilled water and subsequently combined. A large proportion of individuals in different preparations was found to have paired after a few hours. Drops of this material were transferred to slides and fixed at different times during a 72-hour period: The slides were inverted over a 2% solution of OsO_4 for 10 seconds, allowed to evaporate until the drops ceased to flow and immersed in 95% ethanol. They were then stained by the Feulgen procedure and counterstained in 0.1% fast green in 95% ethanol. Various stages of conjugation were located in these preparations.

In order to obtain exconjugants, starved cultures were also combined in a few cc of water in a stender dish. Twelve conjugating pairs were subsequently removed into separate dishes, and, following their separation, individual exconjugants were isolated into test tubes of fresh culture medium. Two clones of exconjugants, designated arbitrarily as D 1 and D 2, were derived in this fashion from a single pair of IB and IIB. Samples of two-day-old subcultures of these were fixed and stained in the manner previously indicated.

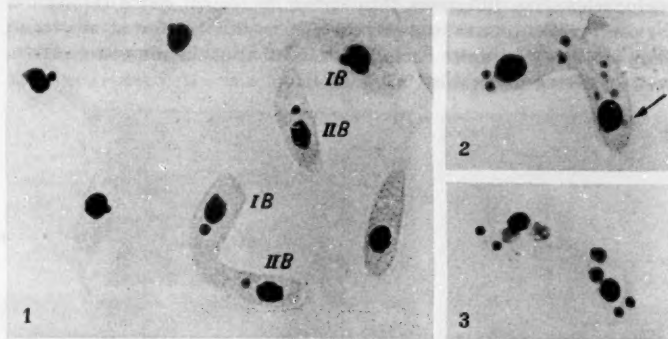
For a comparison of micronuclear sizes, groups of 100 micronuclei chosen at random from each of four different preparations were drawn at a magnification of 3000 x by means of a camera lucida. The largest and smallest diameters of individual micronuclei were measured on these drawings. Frequency distributions of average micronuclear diameters are given in figure 4.

In order to compare the growth characteristics of different strains their growth curves were determined in terms of optical densities of cultures at various times. The results of a typical experiment are given in figure 6. Measurements were conducted at a wavelength of 650 m μ in a Bausch and Lomb "Spectronic 20" colorimeter, using previously calibrated test tubes and inocula from young cultures adjusted to identical densities. Growth characteristics of our four strains (IB, IIB, D 1 and D 2) were compared also with those of newly obtained subcultures of I and II from ELLIOTT's laboratory; these will be designated as IE and IIE.

Results

Conjugating pairs which had not yet begun to undergo the characteristic nuclear changes leading to the first meiotic division invariably consist of members containing micronuclei of strikingly different size. This is illustrated in figure 1 where two such attached pairs are shown. The characteristic micronuclear crescents which soon develop also reveal a noticeable difference in chromatin content, as do the two pairs of interphase nuclei formed after the first meiotic division. After the second division each member of a pair contains four haploid nuclei of

similar size; the four nuclei in a IB individual are however conspicuously larger than those of its IIB partner (see figure 2). In figure 3 a conjugating pair in the last stages of the nuclear reorganization process is



Figs. 1—3. Feulgen-Fast green preparations of conjugating pairs. $\times 600$. (The structure at the end of the pointer in fig. 2 is not a micronucleus, but a tuft of fibrils projecting from the surface of the macronucleus)

shown: the large dark-staining masses represent the old macronuclei, the large light-staining bodies are the newly developing macronuclei and the small dark-staining bodies are the new micronuclei. Unlike the con-

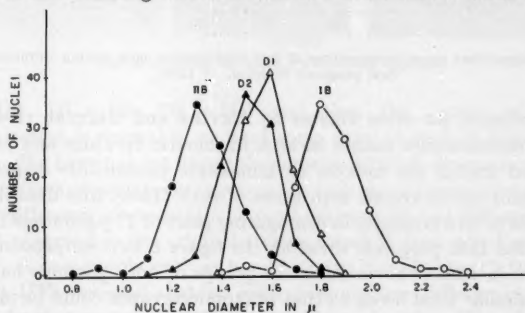


Fig. 4. Frequency distributions of micronuclear diameters in four different 2-day-old cultures

dition which obtained prior to micronuclear exchange and fusion, the new micronuclei appear now to be similar in size in both members of a pair. While the parent strains could be told apart at a glance on the basis of the micronuclear size and staining difference, such a distinction is no longer possible between the exconjugant clones D1 and D2. In figure 4 frequency distributions of average micronuclear diameters from

cultures of IB, IIB, D1 and D2 are shown. While IB and IIB give almost completely separate distributions, D1 and D2 overlap widely and both are intermediate in size between the parent strains. The micronuclear size differences thus appear to remain stable throughout the conjugation process and present a consistent picture at all stages. Similar differences in size or chromatin content of the respective macronuclei were not noticeable.

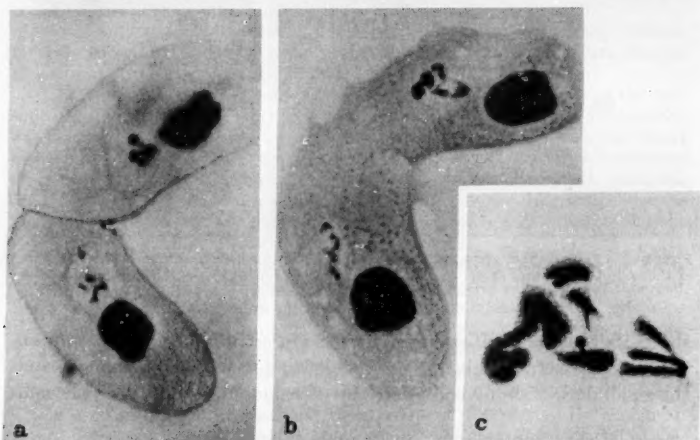


Fig. 5. Feulgen-Fast green preparations of two conjugating pairs during prophase of the first pregamic division. $\times 1350$

As discussed for other ciliates by DEVIDÉ and GEITLER (1947), individual chromosomes cannot be seen in somatic divisions and can only be studied during the meiotic or immediate postmeiotic stages. Our observations are in accord with those of RAY (1956) who described the occurrence of five bivalents in conjugating pairs of *T. pyriformis* I and II prior to the first pregamic division. In figure 5 two conjugating pairs are shown in which the chromosome groups of both partners happened to lie at similar focal levels so that photomicrographs could be made for direct comparison. These are in first meiotic prophase, and both pairs are oriented in such a way that the IB individual is above and the IIB partner below. In the IIB individual of figure 5 a five separate bivalents can be distinguished; it was later found (see below) that these correspond to the figures pictured by RAY (l. c.). The IB cell of figure 5 b also contains five distinct chromosome groups at a somewhat earlier, less condensed stage than those of the other pair. In figure 5 c they are drawn at higher magnification in greater detail than that disclosed by

the photomicrograph. A comparison between the bivalents of the two mating types in these figures reveals that they differ greatly in dimensions, but not in number: those of IB individuals are thicker and stain more heavily than the others. Similar differences have consistently been seen by us in other pairs resulting from several matings.

The mating reactions of the exconjugant strains D1 and D2 have also been tested. It was found that they conjugate in the pattern

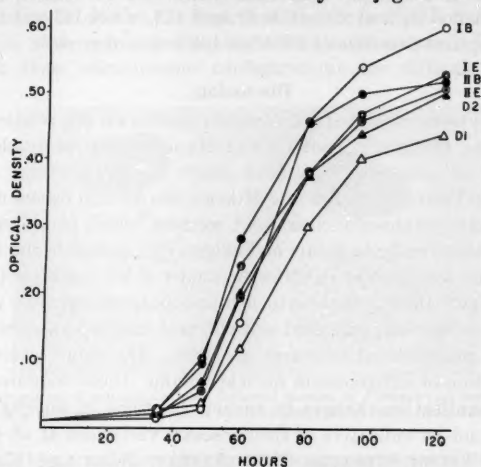


Fig. 6. Growth curves of six different cultures

D1 \times D2, D1 \times IB, D2 \times IIB and that the course of nuclear reorganization is normal in at least some pairs of each of these combinations. We have not yet been able to make detailed observations on the configurations of meiotic chromosomes in such second generation matings.

The difference in chromatin content between IB and IIB micronuclei was not observed in the original strains I and II from which ours were derived. A new supply of these parent strains from ELLIOTT's laboratory (IE and IIE) revealed that no such micronuclear differences exist at present in that material; it became evident also that IE and IIE are cytologically indistinguishable from IIB, and that IB, the strain with large micronuclei, represents the aberrant form which must have arisen during the time this material was carried in the California laboratory.

In order to account for the possible origin of the strain IB comparative growth studies have been made (see figure 6). Under optimal conditions, when newly inoculated cultures are kept in slanted tubes and shaken every few hours before measurements of optical density are made,

there is very little difference between the growth of these cultures, although IB appeared to do slightly better than the others in several experiments and D2 grew slightly less well than the rest. When conditions are less favorable and the cultures are kept in upright tubes for several days without agitation, growth of IB and of both exconjugants is appreciably faster than that of the other strains, although all of them grow less well than under more favorable conditions; cultures of IB, D1 and D2 reached optical densities around 0.3, while IE and II levelled off below optical densities of 0.2 after 140 hours of growth.

Discussion

Many cytochemical and karyometric studies on the relations among nuclear size, chromatin content and chromosomal multivalence, e. g. polyploidy or polyteny, have been made in recent years. From the work of the VENDRELYS, RIS and MIRSKY, SWIFT and others it is known that in many instances nuclear DNA content, which can be determined microphotometrically in terms of Feulgen dye, parallels the number of chromosome sets present in different nuclei of an organism (see review by VENDRELY 1955). Such cytochemical measurements do not permit a distinction between polyploid and polytene conditions, either of which results in proportional increases of DNA. The same is true for the interpretation of differences in nuclear volume; these, moreover, may be due to quantitative changes in various fractions of nuclear substance and need not be indicative of chromosomal variations at all (cf. SCHRAEDER and LEUCHTENBERGER 1950; ALFERT, BERN and KAHN 1955). A combination of cytological and cytochemical techniques is therefore necessary for complete elucidation of quantitative relationships among nuclei containing different chromosome sets (see, especially, the most recent work of SCHRAEDER and HUGHES-SCHRAEDER 1956).

Even when the errors inherent in measurements of such small objects are taken into account, a definite difference in chromatin content between micronuclei of IB and IIB can be established by combined application of cytochemical and karyometric procedures. The Feulgen-DNA contents of the two types of micronuclei occur in an approximate 2:1 ratio (ALFERT and GOLDSTEIN 1955) and the respective nuclear volumes show an even greater difference. The observation of meiotic chromosomes now suggests the chromosomal basis of this condition: most likely we are dealing here with an instance of differential polyteny since the dimensions of the chromosomes and not their numbers differ in the two members of each conjugating pair. This distinction will be best appreciated by a comparison of our figure 5 with figure 7 (reprinted from CHEN 1940b, with the kind permission of the author). Figure 7 illustrates a typical polyploid relationship

among ciliate micronuclei at an early first meiotic prophase stage and shows different numbers of similarly proportioned chromosome pairs in the two conjugants.

There are two possible alternative explanations which appear to us to be less plausible than that given above: 1. It might be supposed that IB constitutes an ordinary autopolyploid variant of strain I and that the difference in size of the chromosomal packages pictured in figure 5 may be due to the fact that bivalents of IIB individuals are contrasted with regularly forming tetravalents in their IB partners. Although these chromosome configurations are difficult to analyze

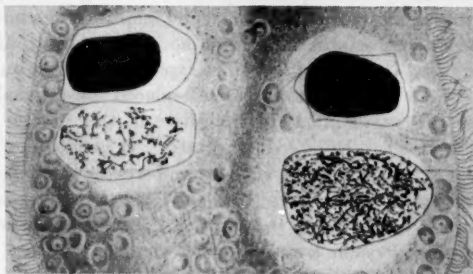


Fig. 7. Conjugation of individuals from different strains of *Paramecium bursaria*; nuclear details of a pair during prophase of the first pregamic division (from CHEN 1940b)

because of their small size, they appear to represent associations of two and-not of four partners. In the cases studied by CHEN (1940b) there also was no evidence for multiple associations of meiotic chromosomes in the presence of a polyploid condition. 2. The difference in chromatin content might be ascribed to a quantitative difference in heterochromatin, and the present case could be considered to furnish a striking parallel to the relationship between the karyotypes of two species of seed plants described by TOBGY (1943). That author observed that differences in chromosome volumes between two parent species of *Crepis* were maintained in their hybrid offspring, but he attributed the parental difference in chromatin content to heterochromatin. However, such an interpretation antedates recent findings about the quantitative behavior of chromatin (see discussion above), and the case of *Crepis* studied by TOBGY may have to be reevaluated in terms of possible differential polyteny, an explanation also presently favored by DARLINGTON (1955). More recently, DASS (1955) described quantitative variations of DNA in micronuclei of a ciliate and attributed them to changing amounts of heterochromatin. It remains to be seen whether the experimental evidence on which that claim is based will be confirmed. DASS himself

considers it to be a rather unique case, different from the condition found in previous similar work on *Chilodonella uncinatus* by SESHACHAR (1950). It also differs from the present instance in that the variations of DNA content reported by DASS are not accompanied by parallel changes in nuclear volume.

It is not known exactly when and under what conditions the strain IB has arisen, and the possible genetic background of the IB karyotype has not yet been studied. Only some general remarks about the mechanism of its origin can be made: Chromosome duplication precedes nuclear division and normally results in a temporary state of polyteny which is corrected by the anaphase separation of daughter chromosomes. The IB karyotype might thus have arisen by inhibition of a micronuclear division following chromatin duplication and a subsequent stabilization of this condition. Owing to their more rapid growth rate under unfavorable conditions such a cell may have replaced the original strain in our cultures. No explanation for the effect of this nuclear condition on the growth rate can be offered at present. It is not known whether autogamy has occurred in these cultures and whether the macronuclear chromosome complements have been affected by the micronuclear alteration. On the other hand, the relation, if any, between cell division and micronuclear division must be rather complex in these organisms since the number of micronuclei per cell can vary considerably in different subcultures of this material (cf. ELLIOTT and HAYES 1953).

Summary

1. A population of *T. pyriformis*, variety I, mating type I, was observed to have conspicuously larger micronuclei than other populations of types I and II.
2. The increased micronuclear size is correlated with increased nuclear DNA content (in terms of Feulgen dye) and with the appearance of meiotic chromosomes which are thicker and which stain more intensely with the Feulgen reaction than those of the conjugating partner.
3. Under certain culture conditions individuals with larger micronuclei exhibit a more rapid growth rate than other populations.

References cited

- ALFERT, M., H. A. BERN u. R. H. KAHN: Hormonal influence on nuclear synthesis. IV. *Acta anat. (Basel)* **23**, 185—205 (1955). — ALFERT, M., and N. O. GOLDSTEIN: Cytochemical properties of nucleoproteins in *Tetrahymena pyriformis*. *J. of Exper. Zool.* **130**, 403—422 (1955). — CHEN, T. T.: Polyploidy and its origin in *Paramecium*. *J. Hered.* **31**, 175—184 (1940a). — Conjugation in *Paramecium bursaria* between animals with diverse nuclear constitutions. *J. Hered.* **31**, 185—196 (1940b). — CLEVELAND, L. R.: The whole life cycle of chromosomes and their coiling systems. *Trans. Amer. Phil. Soc.* **39** (I), 1—100 (1949). — DARLINGTON, C. D.:

The chromosome as a physico-chemical entity. *Nature* (Lond.) **176**, 1139—1144 (1955). — DASS, C. M. S.: Desoxyribose nucleic acid content of micronucleus in *Epistylis articulata*. *Physiologic. Zool.* **28**, 308—314 (1955). — DEVIDÉ, Z., u. L. GEITLER: Die Chromosomen der Ciliaten. *Chromosoma* **3**, 110—136 (1947). — ELLIOTT, A. M., and R. E. HAYES: Mating types in *Tetrahymena*. *Biol. Bull.* **105**, 269—284 (1953). — ELLIOTT, A. M., and D. L. NANNEY: Conjugation in *Tetrahymena*. *Science* (Lancaster, Pa.) **116**, 33—34 (1952). — GRELL, K. G.: Die Entwicklung der Makronucleusanlage im Exconjuganten von *Ephelota gemmipara*. *Biol. Zbl.* **68**, 289—312 (1949). — HARTMANN, M.: Polyenergide Kerne. *Biol. Zbl.* **29**, 481—487, 491—506 (1909). — MACDOUGALL, M. S.: Cytological observations on gymnostomatous ciliates, with a description of the maturation phenomena in diploid and tetraploid forms of *Chilodon uncinatus*. *Quart. J. Microsc. Sci.* **69**, 361—384 (1925). — RAY, C., jr.: Meiosis and nuclear behavior in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.* **3**, 88—96 (1956). — SCHRADER, F., u. S. HUGHES-SCHRADER: Polyploidy and fragmentation in the chromosomal evolution of various species of *Thyanta* (Hemiptera). *Chromosoma* **7**, 469—496 (1956). — SCHRADER, F., and C. LEUCHTENBERGER: A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus*. *Exper. Cell Res.* **1**, 421—452 (1950). — SESHACHAR, B. R.: DNA content of the ciliate micronucleus. *Nature* (Lond.) **165**, 848 (1950). — TOBGY, H. A.: A cytological study of *Crepis fuliginosa*, *C. neglecta*, and their F_1 hybrid, and its bearing on the mechanism of phylogenetic reduction in chromosome numbers. *J. Genet.* **45**, 67—111 (1943). — VENDRELY, R.: The desoxyribonucleic acid content of the nucleus. In: *The Nucleic Acids*, Vol. II. New York: Academic Press 1955.

Prof. M. ALFERT, Dept. of Zoology,
University of California, Berkeley 4, Calif., USA

From the Department of Biology, The Johns Hopkins University, Baltimore

A CYTOPHOTOMETRIC STUDY OF CHROMOSOME PAIRING

By

HUDSON ANSLEY

With 14 Figures in the text

(Eingegangen am 9. August 1956)

Introduction

The pairing of chromosomes was associated with a chemical basis in a previous study (ANSLEY 1954). That study was confined to a single organism and one in which conditions were highly unusual. The findings, therefore, did not admit of a general interpretation. The work has been extended to an entirely different organism. Here again pairing and non-pairing chromosomes are regular features of spermatogenesis. The first study was of the house centipede, *Scutigera forceps* RAFINESQUE, which possesses a dual testis, in one part of which — the microtestis — the chromosomes do not synapse. The present study was made on *Loxa flavicollis* DRURY, a member of the Family *Pentatomidae*, the cytology of which was worked out by SCHRADER (1945a and b), and which also possesses a dual spermatogenesis. In *Loxa* a single lobe of the testis — the harlequin lobe — is asynaptic. Both animals lend themselves, by virtue of possessing both synaptic and asynaptic cells, to cytophotometric analysis of the pairing of chromosomes. Since the taxonomic relationship between them is not close, and since the cytological peculiarities are similar only in the one feature that bivalents are never formed in one region of the testis, conclusions of a more general nature can now be drawn concerning certain of the chemical factors that may be involved in pairing.

Acknowledgments. Travel funds for collecting *Loxa* were granted by the American Academy of Arts and Sciences. The advantages of *Loxa* for comparison with *Scutigera* were pointed out to me by Prof. FRANZ SCHRADER of Columbia University, who also kindly gave me fixed material of four specimens. Valuable suggestions for the improvement of the manuscript were made by Prof. SCHRADER, by Prof. CARL SWANSON of Johns Hopkins University, and by Dr. SALLY HUGHES-SCHRADER of Columbia University. The cytophotometer was built by Mr. NELSON KRAUSE of Johns Hopkins University.

Materials and Methods

Eight male specimens of *Loxa flavicollis* were collected in Panama. The testes of four of these, including all of those used in the cytophotometric study, were fixed in 10% neutral formalin. One testis of each animal was stained with the Feulgen reaction for DNA (desoxyribonucleic acid), and the other with Alfert and Ge-

schwind's Fast Green method for histones (ALFERT and GESCHWIND 1953). For cytological examination the formalin-fixed material is not satisfactory. For this purpose the specimens provided by Prof. SCHRADER were used. These were fixed in Sanfelice's solution and stained with Feulgen. Instrumentation and method of measurement were the same as those described earlier (ANSLEY 1954).

Problems of sampling merit mention. Camera lucida drawings were made of serial sections of entire lobes, and code numbers assigned to each cyst of cells to designate map-position and stage of development. All whole nuclei which were not overlapped were numbered. Cytophotometric measurements of these nuclei were then made by following these maps. Thus cells of every stage were included in all samples, and sampling was random. The samples which were compared had received identical treatment, moreover. Where differences between normal and harlequin cells were found, additional cells of the same stage were mapped and measured. Large enough samples of every stage were taken in order to insure that all cytophotometrically detectable differences were found. Attention was paid, however, only to differences which were large and highly significant.

One of the greatest sources of error is the measurement of nuclear diameters. This measurement is not as reproducible as the measurement of extinctions. The cytophotometer gives reproducible results to within one per cent. Camera lucida drawings are not reproducible to within 10%. The filar micrometer, which is more than twice as accurate as the camera lucida, was used in this study.

Cytological Review and Observations

The cytology of *Loxa* has been described by SCHRADER (1945a and b), and no more than the essential features need be mentioned. The diploid number of chromosomes is 14; $2n\delta = 12+X+Y$. All spermatogonia have this number, including those of the harlequin lobe. The haploid number is 7, and normal spermatocytes have 6 bivalents plus the XY pair (Figs. 1, 2). But in the harlequin lobe all chromosomes act as univalents. Although a typical prophase is simulated in the harlequin lobe, so that it somewhat resembles the normal condition stage for stage, the diploid number can be counted soon after the chromosomes emerge from the contraction figure; which corresponds to zygotene (Figs. 3, 4). From this it might be expected that the harlequin spermatocytes would show 14 chromosomes on a metaphase plate, and such would undoubtedly be the case if an extraordinary regrouping did not occur before diakinesis. The membranes of the cells break down at this time and cells fuse, much as in the "multiploid" barley described by SMITH (1942). Nuclei assemble in aggregates of various sizes, and apparently at random, as may be seen in Fig. 5. During this stage many nuclei divide by constriction, i.e. amitotically. In the end a dramatic heteroploidy prevails in the harlequin metaphase plates, some plates containing up to 150 chromosomes or more, while the vast majority contain fewer than the normal diploid number (Fig. 6). About 4/5 of the plates are deficient, while about 1/5 are overburdened with chromosomes. A second maturation division (Fig. 7) ensues in which the chromosomes form sticky bridges. Sperms

containing one to 75 chromosomes, or more, are then formed without difficulty or abnormality except for the heteroploidy.

The number of cells per cyst is constant at any given stage. The number of primary spermatocytes per cyst is 128, that for secondary spermatocytes is 256, and that for spermatids is 512. This condition is found in the harlequin lobe as well as the normal lobes. This is to say that spindle-number is perfectly normal in the harlequin lobe and that

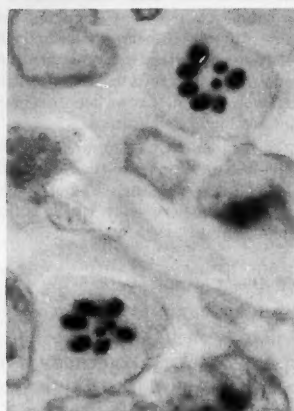


Fig. 1

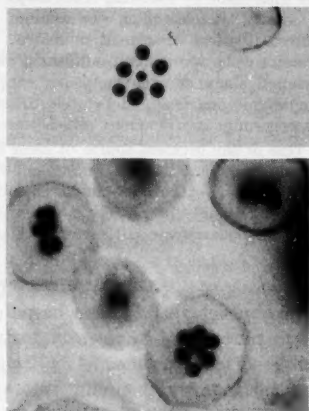


Fig. 2

Fig. 1. Metaphase I of the normal lobes of *Loxa* shows 6 bivalents plus an XY pair in the most typical arrangement. The autosomes surround the sex chromosomes. This is an Alfert-Geschwind Fast Green preparation

Fig. 2. Metaphase II of the normal lobes of *Loxa* shows 7 dyads. The sex chromosomes pair in a "touch and go" manner at this division. Plates of two different specimens are shown. The upper plate, having a light photographic background, is of a Feulgen preparation after Sanfelice fixation. The lower plate, having a dark photographic background, is stained with Fast Green after treatment with hot trichloroacetic acid

centrioles do not aggregate as do the chromosomes. Cellular integrity is not lost in the harlequin lobe despite all appearances to the contrary. Since these observations of SCHRADER are rather astonishing, the work was repeated and confirmed. In addition, an effort was made to test SCHRADER'S assumption that both divisions are equational. To this end a count was made of all the chromosomes at metaphase I in one cyst of the harlequin lobe. The count was 1,846 chromosomes. The number expected on the basis of asynapsis is $14 \times 128 = 1,792$. A certain error cannot be avoided, because many plates are obliquely tipped. The count confirms the clear cytological evidence that the chromosomes of late meiotic prophase are univalents and the first division is equational.

SCHRADER concludes that the second division is equational also, since no pairing is observable and the chromosomes of the second division are smaller than those of the first. As SCHRADER (1945 b) has shown, and as Figs. 6 and 7 also indicate, the metaphase II chromosomes of the harlequin lobe have approximately only one half the mass of the metaphase I

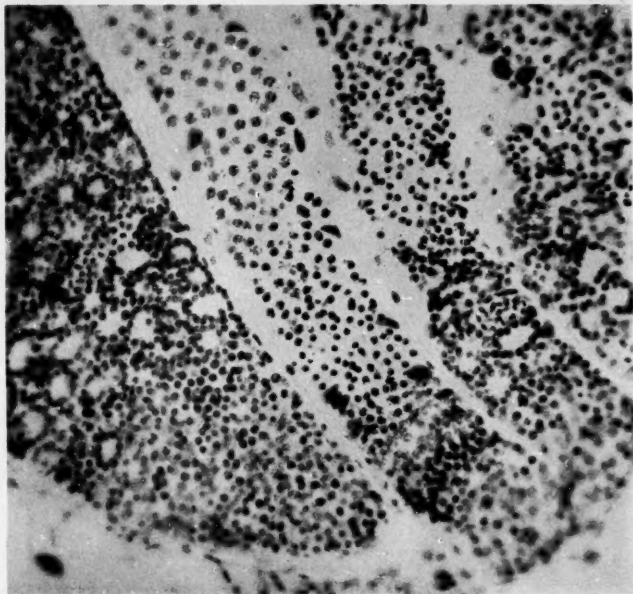


Fig. 3. A section through the testis of *Loxa* shows the obvious division into lobes, four of which are shown here. The one on the left is the harlequin lobe, which is always the largest. The contraction figures, corresponding to zygotene, form conspicuous bands in the two normal lobes in the center. This is a Feulgen preparation with Sanfellece fixation

chromosomes, which would not be expected if the second division were reductional. Chromosome size is, however, subject to many variations, and my own findings suggest that a numerical reduction does take place in the second division of the harlequin lobe, although I have not been able to show how it is brought about. The evidence for reduction is briefly as follows: 1. The chromosomes in one complete cyst of late metaphase II were counted, and the number was found to be 1,907. If the second division were equational, 3,584 chromosomes would be expected. 2. In plates of metaphase I, even numbers of chromosomes predominate over odd (Fig. 8 and Table 1). This highly significant point was checked

by counting the hypodiploid plates of three complete cysts of metaphase I. Less than 7% were odd-numbered. 3. The average number of chromosomes per plate is smaller at the second division than at the first. For instance, the largest plate of the first division (137) is about twice as large as the largest plate of the second division (71). The largest

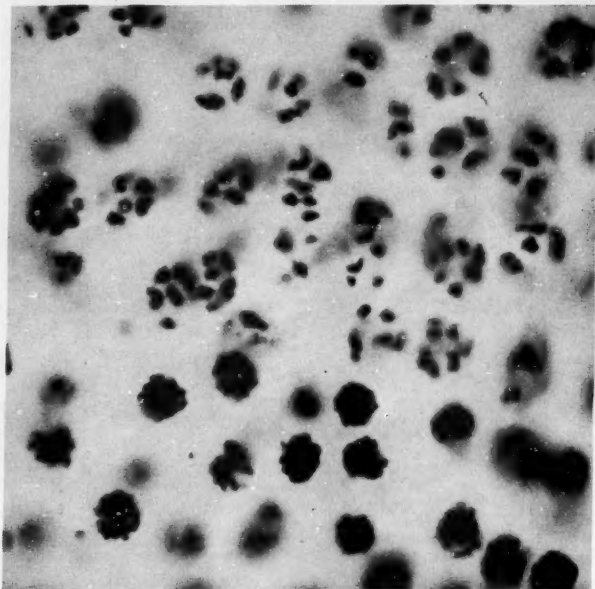


Fig. 4. The contraction figure of the harlequin lobe is shown in the lower part of this photograph. In the upper part of the photograph are cells of a succeeding stage which betray the peculiar asynaptic character of the harlequin lobe, for the diploid number is present in each nucleus. This is of the same section as shown in Fig. 3

first division figure which SCHRADER could find had up to 200 chromosomes. The largest second-division figure in my material appears to have not more than 75 chromosomes. The small plates show a similar reduction in size. For instance, in the first harlequin division the smallest plates are those possessing two chromosomes; none are found which can be certified to possess only one. This fact was also noted by SCHRADER. But in the second division, plates with but a single chromosome are frequent. In fact they are more frequent, if not twice as frequent, than those containing two chromosomes in the first division. A similar tendency towards reduction in chromosome number per plate is noti-

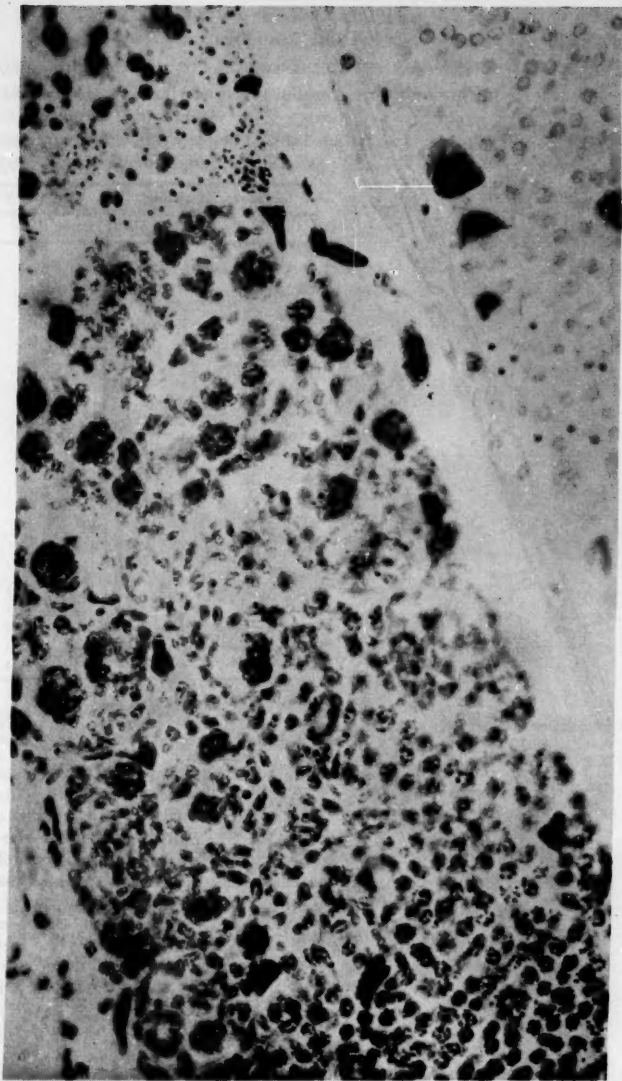


Fig. 5. Later developments of the harlequin lobe are shown in this photograph. The assembly of the nuclei into aggregates of variable sizes may be seen. At the upper left are harlequin spermatids. The great variability in size may be seen by comparing them with the normal spermatids visible on the upper right. This is the same section shown in Figs. 3 and 4

ceable in plates of every size (Table 1 and Fig. 8). It is unfortunate that my material offers only one complete cyst of the second harlequin

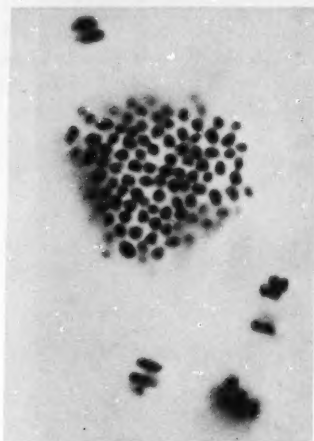


Fig. 6

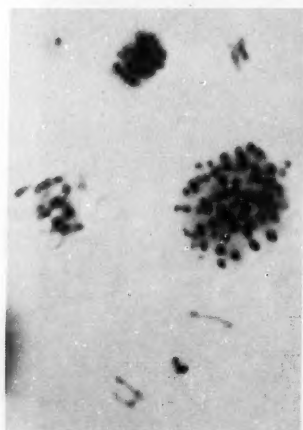


Fig. 7

Fig. 6. Metaphase I of the harlequin lobe shows the extreme heteroploidy, ranging from 2 to 200 chromosomes per plate. This is a Feulgen preparation after Sanfelice fixation

Fig. 7. Anaphase II of the harlequin lobe shows a corresponding heteroploidy. Plates are crowded, and chromosomes are connected by sticky bridges.

Preparation is the same as in Fig. 6

Table 1. The data represented graphically in Fig. 8 are presented here in tabular form

Number of Plates		Number of Chromosomes per Plate
Meta I	Meta II	
0	16	1
11	70	2
4	63	3
53	40	4
4	14	5
21	7	6
0	4	7
5	3	8
0	2	9
10	10	10-20
4	11	20-30
3	4	30-40
1	3	40-50
4	3	50-60
1	5	60-70
2	1	70-80
0		80-90
1		90-100
1		100-110
1		110-120
1		120-130
1		130-140
128	256	Total no. Plates per Cyst

Chromosome counts of one complete cyst of both harlequin maturation divisions are shown in the two columns on the left. The counts are listed in order of increasing plate size (righthand column). That the data are on the average consistent with the assumption of a reductional second division may be seen by comparing the number of first-metaphase plates containing 2 chromosomes with those of the second containing 1 chromosome, those of first-metaphase containing 4 chromosomes with those of the second containing 2, etc.

division in which the chromosomes are suitable for counting under these extremely exacting conditions. This weakness is partially offset by the finding that the number of chromosomes per plate is reduced on the average at the second division. Yet the question of whether the second division is equational or reductional must remain open until the conflicting evidence is resolved. Certainly it is easier to assume that the

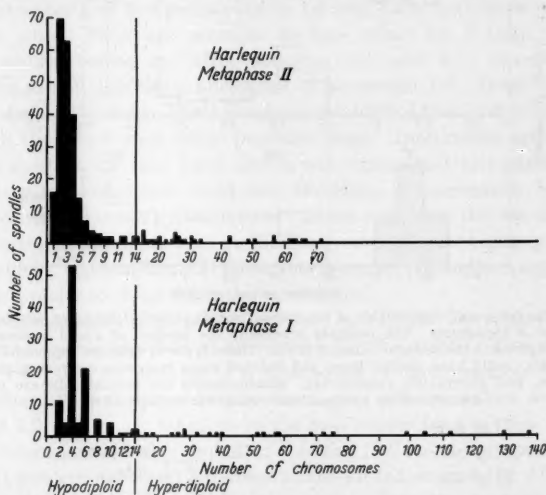


Fig. 8. The chromosome counts of every plate in one cyst of both the harlequin maturation divisions are presented in graphic form. The number of chromosomes per plate is taken for the abscissa. For numbers greater than 14 (vertical line) the scale is reduced for sake of convenience. The ordinate represents the number of plates counted. The first harlequin maturation division is plotted in the lower diagram, and the second maturation division is shown above.

second division is equational, for a reduction introduces several new problems, such as whether homologues are involved. The predominance of even-numbered plates in the first division suggests that homologues do stay together. It remains to be shown how.

If a reduction does take place at the second harlequin division, a partial analogy is presented by the sex chromosomes of many Hemiptera, including *Loxa*. The X and Y chromosomes remain separate in the first metaphase (Fig. 1), but they appose and pass to opposite poles in the second. It appears possible that the autosomes of the harlequin lobe behave like heterochromosomes. The question of reduction is a digression to the present inquiry, however. Asynapsis, the main point at issue, has been proved beyond possibility of doubt.

Cytophotometric Observations

The cytophotometric observations may be stated very simply. Harlequin cells through a stage corresponding to diplotene are normal

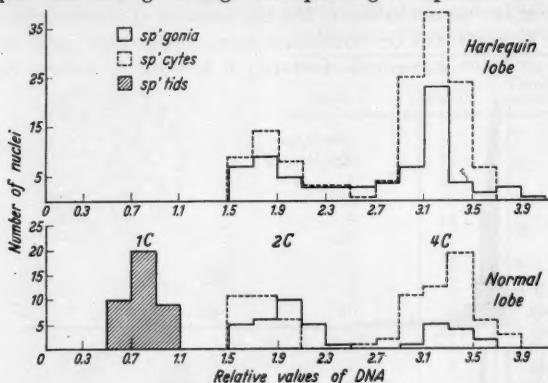


Fig. 9. The frequency distribution of the measurements of DNA (Feulgen) are presented by means of histograms. The ordinate represents the number of nuclei measured; the abscissa represents the relative value of DNA. Three types of cells are represented in the same graph. Solid lines, dotted lines, and hatched areas represent spermatogonia, spermatocytes, and spermatids, respectively. Measurements for normal cells are given in corresponding position below those for harlequin cells

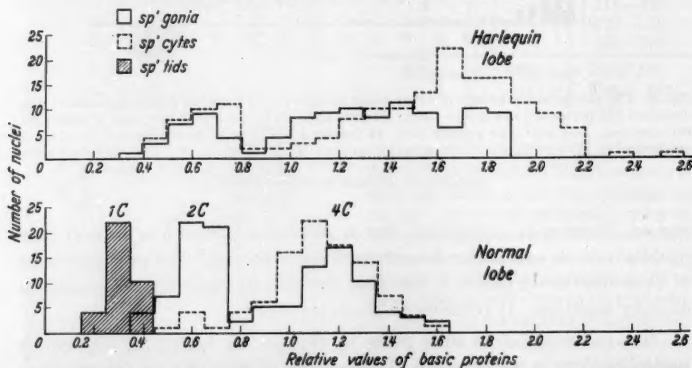


Fig. 10. The frequency distribution of the measurements of histone (Alfert-Geschwind Fast Green) are presented by means of histograms. All mechanics of the graphs are the same as in Fig. 9

with respect to DNA, but markedly abnormal with respect to histones, or basic proteins. The complete normality of DNA in both lobes is shown in Fig. 9. The extraordinary staining reaction of the histones is shown in Fig. 10.

The DNA results are as follows. A relative value of about 0.8 (0.795 ± 0.021) was found for the normal spermatids. It was, of course, impossible to obtain a value characteristic for the harlequin spermatids, owing to their variable heteroploid condition. The value of 0.8 is taken to be the base value (1 C) for a haploid set of chromosomes. This is not an absolute value but a relative one. Spermatogonia and primary spermatocytes give two peaks close to 1.6 and 3.2 in both harlequin and normal lobes. These are taken to be base values for a diploid set of chromosomes before and after doubling (2 C and 4 C, respectively). Interphase and leptotene nuclei fall at or around 1.6. Doubling thus occurs during zygotene. The 4 C value is established then and maintained through the latest measurable prophase stage. Interkinesis appears to be non-existent, or very brief, and is not represented in my material; secondary spermatocytes could not, therefore, be measured. Somatic nuclei of the columnar epithelium of various regions of the vas deferens were measured but did not fall on this scale, since all were highly polytene or polyploid, the smallest and most homogeneous populations appearing to be ten-ploid, to judge from the extinctions.

The histone results for normal cells are as follows. The relative value for normal spermatids falls at around 0.3 (0.295 ± 0.009). This is taken as the 1 C value for histones of a haploid set of chromosomes. Normal spermatogonia and spermatocytes both gave relative values at about 0.6 and 1.2. These are taken to be the base values for a normal diploid set of chromosomes before and after doubling (2 C and 4 C, respectively). Normal pre-leptotene and leptotene nuclei all fall around the 2 C value of 0.6. Doubling occurs during zygotene, when the highest values (around 1.2) are found. Diplotene cells fall back slightly in histone-value to about 1.0. The difference is not significant because of differences in distribution of the chromatin between these stages. In normal lobes the histone picture is thus the same as that for DNA. The relationship is 1:1 at every stage.

A departure from this pattern is found in the harlequin lobe. True, both spermatogonia and spermatocytes establish a 2 C class at 0.6, which corresponds to the normal. All interphase and leptotene nuclei, together with spermatogonia of small diameter, fall in this class. But large spermatogonia and later spermatocytes range from 4 C to 6 C or higher. This means that after each mitosis the histone/DNA ratio is 1, but as the nuclear volume doubles, it becomes 3/2 or more. In other words, the histones increase half again as much, or more, than the DNA. The essential difference between normal and harlequin cells is that the 4 C value does not set an upper limit for histones in harlequin cells. Instead of stopping at 1.2, harlequin spermatogonia range as high as 1.8 and spermatocytes even higher. The highest histone values are reached

in the stage which corresponds to a late zygotene in the normal lobes. If mean values for each cyst are plotted, instead of raw data, then peaks

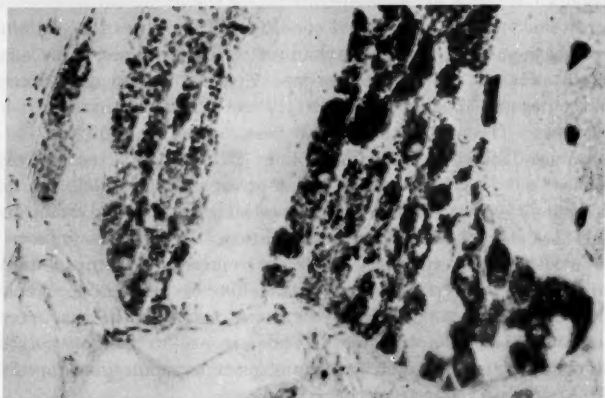


Fig. 11. A section through the testis of *Loza* shows a large, irregularly shaped harlequin lobe on the right and two normal lobes on the left. This is an Alfert-Geschwind Fast Green preparation

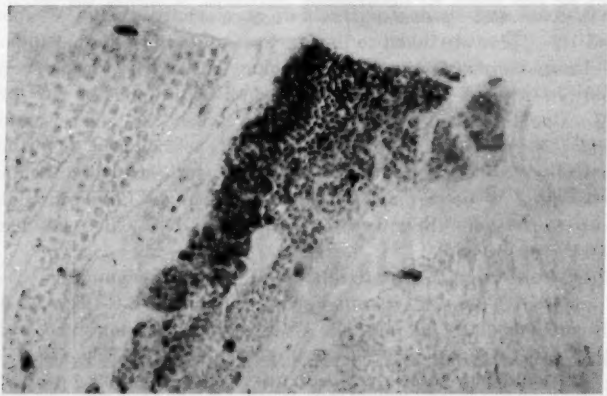


Fig. 12. A section through a similar preparation, but of a different section from that of Fig. 11, shows a typical appearance after an Alfert-Geschwind preparation is destained. Only the harlequin lobe retains any color

are seen at 1.2, 1.5, and 1.8. These peaks are noticeable in the pooled raw data (Fig. 10) for spermatogonia. The pyramidal distribution of spermatocytes is caused by the fact that pachytene and diplotene nuclei fall back to around 1.6. All early zygotene nuclei together form a class

at 1.29 ± 0.09 ($N = 39$). All later spermatocytes together form a class at 1.79 ± 0.02 ($N = 90$).

The higher histone values are not a function of nuclear volume, for harlequin cells are actually smaller than their normal counterparts. Their diameters average half a micron less, stage for stage. (Normal nuclei range from about 3 to 6μ , and harlequin nuclei from about 2.5 to 5.5μ .)



Fig. 13



Fig. 14

Figs. 13 and 14. Metaphase I of normal and harlequin cells of the same section are compared after the destaining of an Alfert-Geschwind preparation. The harlequin chromosomes are still intensely colored (13), while those of the normal cells are virtually colorless (14)

Although Fast Green is very stable, it can be destained in acid alcohol. Normal cells of *Loxa* relinquish the dye more readily than do the harlequin cells. The harlequin lobe can be readily differentiated from the normal lobes in this way. The contrast is most striking, and holds even for mature sperms. In Figs. 11 and 12 stained and destained sections of the testis of *Loxa* are compared. The harlequin lobe is almost unaffected. In Figs. 13 and 14 destained metaphase chromosomes of normal and harlequin cells of the same section are compared. Such a result is not necessarily expected, and demonstrates that the affinity for the Alfert-Geschwind stain is greater for harlequin chromosomes than for normal. Similar preparations of *Scutigera* were also destained with the same result. Chromosomes of the macrotestis still brilliantly stained after two years, lost the stain readily while those of the microtestis retained it.

Discussion

This paper and the preceding study of *Scutigera* constitute the first steps in a projected analysis of the cytochemical factors involved in chromosome pairing. Until a wider range of conditions has been tested, discussion will be limited to a comparison of the findings in *Loxa* and *Scutigera*. Briefly, it may be said that the cytophotometric measurements of the Alfert-Geschwind reaction of asynaptic cells of *Loxa* and *Scutigera* show a 50% increase over the normal, synaptic cells. The question is thus raised of how much the reaction has to do with pairing and what the Alfert-Geschwind staining reaction means.

The normal cells of *Loxa* and *Scutigera* are standard and directly comparable, both chemically and cytologically. DNA and histones follow the classical outline for chromatids and maintain a 1:1 relationship. As the one doubles or halves, so does the other and so do the chromosomes. By contrast, the atypical cells depart from the 1:1 relationship, and they do so in the same direction and to the same degree. The histone/DNA ratio becomes 3/2 in the primary spermatocytes of both the harlequin lobe of *Loxa* and the microtestis of *Scutigera*. In both cases this is preceded by similar peculiarities, though not identical ones, in the spermatogonia. Unless we are dealing with a remarkable coincidence, then, the histones must be concerned with the difference between synapsis and asynapsis, since this is the only point in which *Loxa* resembles *Scutigera*.

In view of the previous speculation on the subject, it is enlightening to discover that protein rather than DNA is involved. Thus we do not have to puzzle over the apparent conflict of "supercharging" of DNA (DARLINGTON 1942) as though this material could be laid on or off the chromosomes without regard to its primary genetic role. The 3/2 ratio of histones to DNA is taken, then, to be the important finding; for this is the point on which *Loxa* and *Scutigera* agree. There is one point on which they disagree. This disagreement is reflected in a pronounced cytological difference. The meiotic prophase of the microtestis is quite unlike that of the harlequin lobe. No trace of leptotene, zygotene, pachytene, diplotene, or diakinesis is present in the microtestis. These stages seem to be completely inhibited. In the harlequin lobe the inhibition is not complete, since, although the chromosomes are not paired and behave as univalents, there is a definite simulacrum of the meiotic prophase stages, as was described in the section on cytological review. In this respect the harlequin lobe of *Loxa* resembles somewhat the asynaptic maize of BEADLE (1930). The harlequin cells commence meiosis with a normal amount of histones and DNA, i. e. with a 2 C value. In the microtestis these constituents of the spermatocytes are prematurely doubled, and possess a 4 C value of histones and DNA from the

start. In both cases, however, the histones increase to a 6 C value while the DNA remains at 4 C. In the harlequin cells this 3/2 ratio of histones to DNA is established at late "zygotene". In the microtestis it is established when the primary spermatocytes have doubled in size. Thus, the result is the same in both cases, the only difference being one of the time of synthesis of nucleoproteins and nucleic acids.

It would perhaps be helpful to make a distinction between *synchronous* and *asynchronous* increases in the amount of histones. A synchronous increase may be taken to mean one which corresponds to the doubling of the chromosomes and to the synthesis of DNA. An asynchronous increase may be taken to mean an increase of histones beyond, or below, the corresponding increase of DNA, and one which is not correlated with chromosome duplication. With respect to the latter, the *asynchronous* increase of histones, *Loxa* and *Scutigera* agree perfectly. They differ only with respect to the former, the *synchronous* increase, or rather to the time at which the synchronous increase occurs. It may be that a premature synchronous increase of chromatin inhibits one part of the pairing mechanism and the asynchronous increase of histones inhibits another. The asynchronous increase is probably the more important of the two. When both are present together, asynapsis is complete. That is, pairing may not even be attempted. When only the asynchronous increase is present, desynapsis may be a better term to use than asynapsis; that is, the chromosomes may pair briefly but immediately fall apart. A premature *synchronous* increase is correlated with an inhibition of the prophase developments, and the *asynchronous* increase with a failure of bivalent formation.

Whereas synchronous increases in the Alfert-Geschwind reaction probably reflect synthesis of additional amounts of histone, an asynchronous increase in the reaction may not represent a real increase in amount of histone, but only an opening up of extra bonds, normally not present or else occupied by DNA or non-histone protein. Bonding sites, not amounts, are probably what are measured, since the stain is thought to form salts with the chromatin (ALFERT 1955a).

It is generally agreed that DNA, histones, and non-histone proteins form an intimate union in living chromosomes, and do not stain chemically unless partially digested or hydrolyzed (POLLISTER 1952). Even in fixed and hydrolyzed material, the histones will not stain until the DNA is removed. In describing the action of his stain ALFERT says that the dye "titrates" the bonds thus rendered available (1955a). It seems natural to assume that histones and DNA always maintain a 1:1 relationship with respect to amount, and that a higher histone value indicates a closer union than usual with DNA, i. e. more bonds between them, or perhaps a different kind of bond. This would explain

how the "amount" of histones is reduced by more than half at a mitosis. The failure to form bivalents may thus be a result of a tightening of the histone-DNA union.

Departures from a 1:1 ratio of histone to DNA have been noted before, but always in the other direction. BLOCH and GODMAN (1955) have found a "lowering" of histones to be correlated with the inability of cells to divide. ALFERT (1955b) has reported a similar case. When he compared the macronucleus and micronucleus of *Tetrahymena pyriformis*, he found that the histone/DNA ratio is 40% lower in the macronucleus. Presumably the macronucleus is incapable of mitosis.

The possibility should not be overlooked that histone is not a single kind of protein but a complex, such as the STEDMAN's (1950) were among the first to propose. If this prove to be the case, the change in staining properties may reflect more than an increased number of bonds between histone and DNA. It may reflect a change in the kind of histone. One might predict a histone of a much higher isoelectric point in the atypical tissues of *Scutigera* and *Loxa* than in the normal. Such a prediction might be tested by direct chemical analysis.

Summary

1. Confirming earlier studies (SCHRADER 1945a and b), the chromosomes of the harlequin lobe of the testis of the pentatomid *Loxa flavicollis* are found to be asynaptic throughout late meiotic prophase and to divide equationally at metaphase I. All other lobes show a normal meiosis.
2. Some new evidence is presented for a reduction in chromosome number in the second meiotic division of the harlequin lobe.
3. Cytophotometric determination of relative amounts of DNA (Feulgen) and histones (Alfert-Geschwind Fast Green) in nuclei of normal and asynaptic lobes show that asynapsis is correlated with a 3/2 ratio of histone to DNA.
4. The 3/2 ratio is interpreted not as an increased amount of histone but as a change in the chemical union between histone and DNA, or alternatively with a change in the kind of histone present.

References cited

- ALFERT, M.: Changes in the staining capacity of nuclear components during cell degeneration. *Biol. Bull.* **109**, 1—12 (1955a). — Cytochemical detection of a difference in protein composition between micronucleus and macronucleus of *Tetrahymena pyriformis*. *Anat. Rec.* **122**, 428—429 (1955b). — ALFERT, M., and I. GESCHWIND: A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **39**, 991—995 (1953). — ANSLEY, H. R.: A cytological and cytophotometric study of alternative pathways of meiosis in the house centipede (*Scutigera forceps* RAFINESQUE). *Chromosoma* **6**, 656—695 (1954). — BEADLE, G. W.: Genetical and cytological studies of Mendelian asynapsis in *Zea mays*.

Memoir 129, Agricult. Exper. Station, Cornell Univ. 1930. — BLOCH, D. P., and G. C. GODMAN: Evidence of differences in the desoxyribonucleoprotein complex of proliferating and non-dividing cells. *J. Biophys. a. Biochem. Cytology* 1, 531—550 (1955). — DARLINGTON, C. D., and T. DOBZHANSKY: Temperature and "sex ratio" in *Drosophila pseudoobscura*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 28, 45—48 (1942). — POLLISTER, A. W.: Nucleoproteins of the nucleus. *Exper. Cell Res. Suppl.* 2, 59—74 (1952). — SCHRADER, F.: Regular occurrence of heteroploidy in a group of Pentatomidae (Hemiptera). *Biol. Bull.* 88, 63—70 (1945a). — The cytology of regular heteroploidy in the genus *Loxa* (Pentatomidae-Hemiptera). *J. of Morph.* 76, 157—178 (1945b). — SMITH, L.: Cytogenetics of a factor for multiploid sporocytes in barley. *Amer. J. Bot.* 29, 451—456 (1942). — STEDMAN, E., and E. STEDMAN: Cell specificity of histones. *Nature (Lond.)* 166, 780—781 (1950).

Prof. HUDSON R. ANSLEY, Department of Biology,
The Johns Hopkins University, Baltimore 18, Md. USA

TEMPERATURABHÄNGIGE ALLOZYKLIE DES POLYTÄNEN X-CHROMOSOMS IN DEN KERNEN DER SOMAZELLEN VON PHRYNE CINCTA *

Von

B. ERICH WOLF

Mit 17 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. Januar/7. Mai 1956)

Inhaltsübersicht

	Seite
A. Einleitung	396
B. Material und Methode	397
C. Befunde	398
1. Allgemeine Beschreibung der Speicheldrüsenchromosomen und ihr Vergleich mit den Mitosechromosomen	398
a) Autosomen. S. 399. — b) Geschlechtschromosomen. S. 402	
2. Die temperaturbedingte Strukturvariabilität des X-Chromosoms	404
3. Gewebespezifische Unterschiede in Streckungsgrad und somatischem Paarungsverhalten des X-Chromosoms.	414
D. Diskussion	419
1. Morphologische Deutung der verschiedenen Erscheinungsformen des X-Chromosoms	419
2. Die Allozyklie des X-Chromosoms und der Kinetochorenabschnitte der Autosomen.	426
3. Vergleichbare morphologische Befunde an den Riesenchromosomen anderer Dipteren	431
Summary	432
Literatur	433

A. Einleitung

Die Heterochromosomen unterscheiden sich hauptsächlich in 2 Merkmalen von den Autosomen: im Kondensationsgrad (Heteropyknose, Ausbleiben oder Verzögerung der telophasischen Auflockerung, voraus-eilende prophasische Verdichtung) und in Abnormitäten ihres Orientierungs- und Bewegungsverhaltens in der Spindel (Heterokinese). Obwohl über die physikalisch-chemischen Determinanten beider Erscheinungen nichts bekannt ist, darf ein kausaler Zusammenhang vermutet werden. Seit HEITZ (1928, 1929) werden Chromosomen oder Chromosomenabschnitte mit abweichendem Kondensationszyklus als „heterochromatisch“ bezeichnet. Während sich Heterochromosomen im allgemeinen als total heterochromatisch erweisen, findet sich „Heterochromatin“ an den Autosomen nur in begrenzten Abschnitten, vornehmlich nahe den Spindelansatzstellen (BELLING 1928, GEITLER 1933, DARLINGTON 1933 usw.). Abgesehen von der Unterscheidung zweier morphologisch verschiedener Heterochromatinarten in den Speicheldrüsenkernen bei

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. HANS NACHTSHEIM zum 65. Geburtstage gewidmet.

Drosophila virilis (α - und β -Heterochromatin, HEITZ 1934), hat der Heterochromatinbegriff keine schärfere Definition erfahren. Wege zu einer Weiterentwicklung haben vor allem WHITE (1937), KLINGSTEDT (1931) sowie DARLINGTON und LA COUR (1940) gewiesen. Während die erstgenannten Autoren mit der Annahme einer lokalisierten Phasenverschiebung gegenüber dem allgemeinen Spiralisationszyklus operierten, betrachteten DARLINGTON und LA COUR die Heterochromatie als eine quantitative Verschiedenheit, hervorgerufen durch lokale, exogen (z. B. durch Temperatur) beeinflussbare Störungen im Nukleinsäurestoffwechsel. Sie stellten hierfür den Begriff „Allozyklie“ auf.

Die vorliegende Untersuchung dient dem Ziel, tiefer in das Wesen der Allozyklie einzudringen und deren eventuellen Zusammenhang mit zytomechanischen, vielleicht auch zytogenetischen Prozessen, zu klären. Herangezogen wird der besonders charakteristische Fall der Heterochromosomen von *Phryne cincta*. Die Abweichungen dieser total heterochromatischen Elemente von der Norm in Mitose und Meiose sind bereits geschildert worden (WOLF 1950). Mit der Einleitung einer Strukturanalyse der Riesenchromosomen wird eine neue Variante des allozyklischen Verhaltens des X-Chromosoms in Gestalt eines, gegenüber den Autosomen stark abweichenden — man könnte sagen „nachhinkenden“ — Längenwachstums im Verlauf der Polyänisierung in den Speicheldrüsenkernen beschrieben. Als Begleiterscheinung tritt eine starke Variabilität des äußeren Baues des X auf, die sich in einem überraschenden Ausmaße als temperaturabhängig erweist. Das Studium der Strukturvarianten des polytänen X von *Phryne cincta* stellt gleichzeitig einen Beitrag zu der Kontroverse zwischen den Vertretern der Polyänietheorie (BAUER 1935, 1936, 1952; BAUER und BEERMANN 1952) und den Verfechtern einer Diskontinuität der Chromosomenstruktur in der Entwicklung der Somazellen (KOSSWIG und SENGÜN 1947a, b, c; SENGÜN 1951a, b, 1954a, b) dar. Ferner wird mit der Aufstellung einer Strukturkarte des X-Chromosoms einer bestimmten Population der erste Schritt getan zur Beantwortung der Frage nach den Verwandtschaftsverhältnissen zwischen den einzelnen strukturverschiedenen X-Chromosomen, die bei *Phryne cincta* gefunden worden sind (WOLF 1954, 1956).

Die Untersuchungen erfolgten mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, der hiermit gedankt wird. Herrn Prof. Dr. HANS BAUER vom Max-Planck-Institut für Meeresbiologie in Wilhelmshaven sowie ganz besonders Herrn Dr. WOLFGANG BEERMANN vom Zoologischen Institut der Universität Marburg danke ich für wertvolle Kritik und Hilfeleistung.

B. Material und Methode

Zur Untersuchung dienten Larven (nebst einer Anzahl frisch verpuppter Individuen) aus Pärchen- und Massenzuchten eines in Inzucht gehaltenen Stammes aus einer Population östlich Berlins. Alle ♀♀ des Stammes besitzen zwei identische X-Chromosomen und sind, wie die ♂♂, konstant frei von überzähligen Y-Chromosomen.

Gezüchtet wurden die Tiere in 11 cm hohen und 7,5 cm breiten Gläsern, die zur Hälfte mit einem Gemisch aus gekochten Kartoffelschnitzeln und feuchtem Sägemehl, dazu einigen Tropfen Hefelösung, angefüllt und mit Gaze verschlossen waren. Als Zuchtträume dienten ungeheizte Instituträume sowie Kühlschrankabteile, die mit einer Genauigkeit von $\pm 1^{\circ}\text{C}$ auf Temperaturen zwischen 0 und 15°C einreguliert werden konnten. Neben der optimalen (17°C) wurden auch andere Temperaturen zwischen 4 und 22°C angewandt. Bei Zimmertemperatur dauert die Embryogenese 3, bei 8° 8–14 Tage. Die Larvenentwicklung variierte bei zwei daraufhin geprüften Nachkommenschaften unter normalen Temperaturen ($17\text{--}20^{\circ}\text{C}$) zwischen 16 und 47 Tagen, bei $4\text{--}8^{\circ}$ zwischen 44 und 98 Tagen.

Untersucht wurden in erster Linie die Speicheldrüsen verpuppungsreifer Larven (bei ihnen ist die Nahrungsaufnahme eingestellt und der Darm entleert); daneben

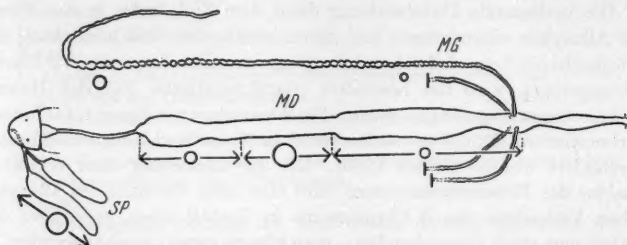


Abb. 1. Darmtraktus einer erwachsenen Larve von *Phryne cincta* mit den Speicheldrüsen und den Malpighischen Gefäßen (MG; nur eines in ganzer Länge); MD Mitteldarm. Halbschematisch. Die Kreise deuten die mittlere Größe der Kerne ($50\times$) in den einzelnen Organen oder Organbezirken an ($7\times$)

oft noch ein bestimmter Abschnitt (2. Viertel) des Mitteldarms, in welchem sich in den Tagen vor der Darmentleerung (3 Tage vor der Verpuppung) hochpolytäre Zellen anfinden (Abb. 1), sowie gelegentlich Malpighische Gefäße und Gonaden. Quetschpräparate wurden nach Fixierung in Alkohol-Eisessig (AE; 3:1) und Färbung mit Karminessigsäure (KE) hergestellt. Um den Streckungszustand der Riesenchromosomen nicht künstlich zu verändern, wurde meist nur schwach gequetscht und nach abgeplatteten Kernen gesucht, in denen die Chromosomen übersichtlich lagen.

C. Befunde

1. Allgemeine Beschreibung der Speicheldrüsenchromosomen und ihr Vergleich mit den Mitosechromosomen

Der mitotische Chromosomensatz von *Phryne cincta* ist bereits beschrieben worden (WOLF 1950, S. 151). Der autosomale Anteil setzt sich aus zwei etwas ungleich großen Paaren V-förmiger, leicht ungleichschenkliger (2 und 3) und einem Paar stäbchenförmiger Elemente (4) zusammen (Abb. 2f). In der Metaphase sind das ebenfalls stäbchenförmige X-Chromosom (1) etwa $\frac{1}{2}$, das fast punktförmige Y rund $\frac{1}{6}$ so lang wie die autosomalen Stäbchen (Abb. 2c).

In den Zellkernen der schlauchförmigen Speicheldrüsen von weiblichen Larven treten dementsprechend 4 Elemente auf. Alle Homologen

sind in ganzer Länge eng gepaart (Abb. 3). In ihren relativen Längen spiegeln sich die Verhältnisse der mitotischen Chromosomen wider, abgesehen vom X-Chromosom, das in der Regel breiter und stark verkürzt erscheint. Ein Sammelchromozentrum wird nicht gebildet, wenn auch die heterochromatischen Abschnitte gelegentlich fusionieren.

a) Autosomen. Im allgemeinen weichen die Autosomen in ihrer Morphologie und in der Art der Querscheibenmusterung nicht von dem typischen Bild der Riesenchromosomen von *Drosophila* und *Chironomus* ab. Sie stehen diesen jedoch in der Klarheit des Scheibenmusters sehr

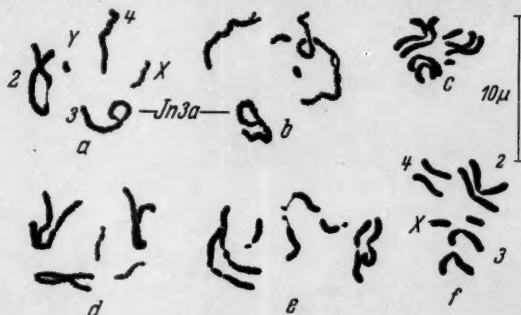


Abb. 2a—f. Mitosechromosomen in Pro- (a, b, d, e) und Metaphase (c, f) von Spermato gonien (a—c) und Oogonien (d—f). Verzögerte prophasische Kontraktion (a, d) und früheres Abklängen der somatischen Paarung (d, e) beim X-Chromosom gegenüber den Autosomen (2—4). In der Kinetochorenregion sind die Autosomen 2 und 4 gelegentlich fadenförmig verschmälert (a bzw. e). An den somatisch gepaarten Prophasenchromosomen werden große Inversionen erkennbar (*yn* 3a in a, b). Fixierung AE, Färbung KE (auch in allen folgenden Abbildungen) (2300 ×)

nach. Das hängt vielleicht mit einer „unzureichenden“ Streckung und Straffheit der Bündelung ihrer Fibrillen zusammen. Durch Aufzucht der Tiere bei niedrigen Temperaturen kann dem jedoch weitgehend abgeholfen werden.

In einer vom Normalbild abweichenden Weise sind alle 3 Autosomen in der Gegend des vermutlichen Sitzes der Kinetochore strukturiert (K, Abb. 3a, b, 6a). Sie weisen hier eine Zone auf, in der das Chromosom stark aufgelockert, fast granulär und etwas verbreitert erscheint (β -Heterochromatin). Am deutlichsten ist das am größten Element des Satzes, Chromosom 2, ausgeprägt (Abb. 4c). Ein weiteres Kennzeichen dieser Region bilden in Chromosom 4 ein, in den Chromosomen 2 und 3 zwei Blöcke aus α -Heterochromatin, die die granuläre Zone auf der einen bzw. auf beiden Seiten begrenzen (in Chromosom 3 treten sie nur gelegentlich deutlich hervor). Eine Eigentümlichkeit des α -Heterochromatins besteht darin, daß in ihm die Chromosomen 2 und 4 eingesehnürt oder bis auf die Breite eines dünnen und oft langen Fadens

verschmälert sein können (*Hf* in Abb. 3a, 4a, b, d). Die 2 Arme des Chromosoms 2, ferner der lange Arm und der proximale Block des Chromosoms 4 treten (auch in nicht gequetschten Kernen) dabei oft weit auseinander. Ein Chromatinfaden, der die Arme dann verbindet, ist — wenigstens bei Chromosom 4 — nicht immer in seiner ganzen Länge verfolgbar. Ähnliche fadenartige Verengungen sind manchmal auch im Spindelansatzbereich der Prophasenchromosomen zu beobachten

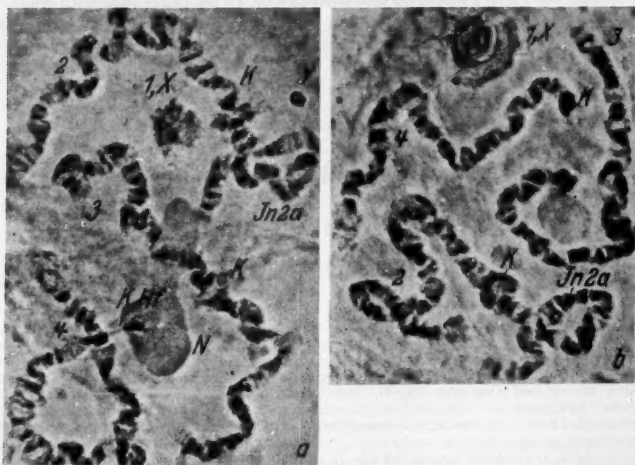


Abb. 3a u. b. Übersichtsbilder von den Speicheldrüsenchromosomen in der verpuppungsreifen, männlichen (a) und weiblichen (b) Larve nach Aufzucht bei 17–22° C. Das X-Chromosom (1) im Habitus von den Autosomen abweichend, granulär (a) oder blattförmig (b), stets breiter und relativ kürzer, als den mitotischen Verhältnissen gemäß zu erwarten. *Jn2a* Große interstitielle Inversion im kurzen Arm des Chromosoms 2; *N* Nukleolus; *K* vermutlicher Kinetochorenabschnitt in den Autosomen (meist als Verbreiterung hervortretend); fadenartige Einengung (*Hf*) im α -Heterochromatin der Kinetochorenregion von Chromosom 4 in a. 800 \times (b) bzw. 1100 \times (a)

(Abb. 2a, c). Mit dem proximalen Block aus kompaktem Heterochromatin ist das Chromosom 4 stets in dem (einzigen) Nukleolus (*N* in Abb. 3a) verankert. Ein netzförmiges „Endbäumchen“ (= β -Heterochromatin) im Nukleolus spricht für die Existenz eines kurzen Armes jenseits der Spindelansatzstelle von Chromosom 4 (Abb. 4a, b). Lage und gleiche relative Größe machen eine Homologie zwischen dem gelegentlich hervortretenden Endknöpfchen des prophasischen Mitosechromosoms 4 und dem am Nukleolus haftenden Heterochromatin „brocken“ des Riesenchromosoms wahrscheinlich (vgl. Abb. 2e mit 3a).

Außer der fakultativen („zentrischen“) Einschnürung im α -Heterochromatin tritt am Chromosom 2 noch eine konstante, tiefe (sekundäre)

Einschnürung in der Mitte des langen Armes auf. An dieser Stelle sind die Fibrillen auf die Breite eines dünnen, einfachen (Abb. 4f) oder doppelten (Abb. 4e, g) Fadens zusammengedrängt. Die Einengung ist proximal durch drei dicht aufeinanderfolgende Querscheiben, distal durch einen kegelförmig zugespitzten Bulbus begrenzt.

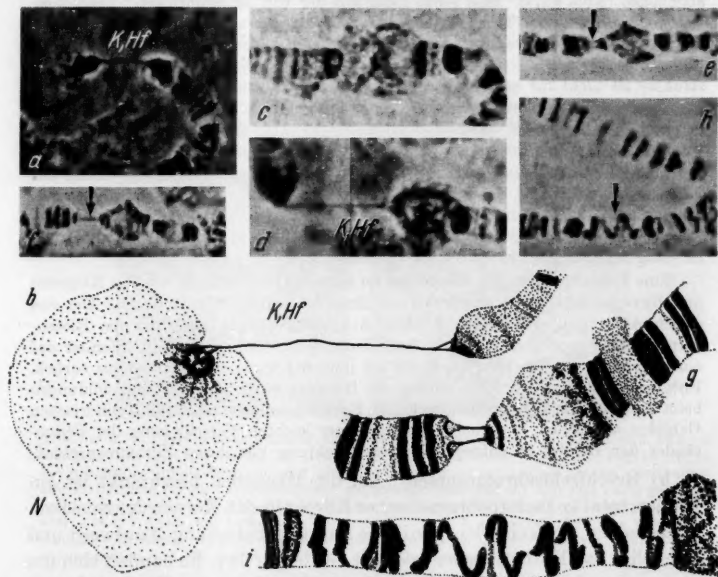


Abb. 4a—i. Strukturbesonderheiten an den Autosomen. α - und β -heterochromatische Abschnitte in den Kinetochorenbereichen (K) von Chromosom 4 (a, b) und 2 (c, d): Das α -Heterochromatin teilweise fadenförmig verengt (HF), das β -Heterochromatin bei Chromosom 2 aufgelockert und verbreitert, bei Chromosom 4 ein (im Nukleolus verankertes) Endbäumchen bildend. e—g Lagekonstante tiefe Einschnürung im langen Arm von Chromosom 2 (in e und g beide Homologen im unmittelbaren Bereich der Einschnürung getrennt). h, i Unbestimmter, hohlzylindrisch gebauter Abschnitt eines Autosoms: „Klemmringstruktur“ (vgl. S. 402). 1000 \times (a, b, e, f), 1200 \times (c, d, h), 2150 \times (g, i)

Zur Markierung des Chromosoms 2 kann außerdem eine in der untersuchten Population häufige, große interkalare Inversion des kurzen Arms herangezogen werden (*In 2a* in Abb. 3a, b), ferner eine sehr kurze Inversion zwischen der sekundären Einschnürung und der Kinetochorenregion. Als Erkennungsmerkmal des Chromosoms 3 kann eine in der Berliner Population sehr häufig auftretende Inversion von nahezu der gesamten Länge des kurzen Arms dienen (*In 3a* in Abb. 6a)¹. Sie

¹ In einem Allgäuer Stamm ist neben dieser Inversion noch eine fast ebenso große, subterminale Inversion (*In 3b*) im langen Arm aufgefunden worden.

konnte auch an den noch somatisch gepaarten Prophasechromosomen erkannt werden (Abb. 2a, b).

Hinzuweisen ist noch auf eine Struktureigentümlichkeit, die an den Speicheldrüsenchromosomen noch nicht verpuppungsreifer Larven gelegentlich beobachtet wird: Hier erweisen sich viele Querscheiben bei genauer Untersuchung als Ringe. Manchmal sind diese Ringe offen und ihre Enden in entgegengesetzter Richtung abgelenkt (Abb. 4h, i). Ihre Form kann mit der von „Klemmrings“ verglichen werden, wie sie in der Technik gebraucht werden. Benachbarte Ringe sind dann oft dergestalt angeordnet, daß sie mit ihren Enden korrespondieren und auf diese Weise eine spiralförmige Konfiguration (Scheinspiralen) bilden. Die „Klemmring“-Struktur ist nicht für bestimmte Chromosomenabschnitte charakteristisch; sie ist aber auf ein Entwicklungsstadium der Speicheldrüsenchromosomen beschränkt, in dem diese besonders zahlreiche Ringscheiben aufweisen, anscheinend also — wenigstens an vielen Stellen — hohlzylindrisch gebaut sind.

Mit zunehmender Dicke der Ringscheiben und mit dem Kompaktwerden der Fibrillenbündel werden Scheinspiralen seltener; in stärker polytänisierten Riesenchromosomen sind kaum noch welche aufzufinden. Zerrung kann nicht die Ursache ihrer Entstehung sein, obwohl sie bei solcher deutlicher werden; sie sind aber auch in völlig ungezerrten Chromosomen zu beobachten.

Eine Bedeutung für das Gefüge im Sinne eines Umbaus, wie ihn KOSWIG und SENGÜN (1947a—c) annehmen, ist ihnen unbedingt abzusprechen. Die von diesen Autoren übernommene Ansicht ALVERDES' (1912), nach der die Riesenchromosomen aus einem einzigen Spiralfaden aufgebaut seien, geht offenbar auf eine Beobachtung von Scheinspiralen bei jungen Larven von *Chironomus* zurück. Entgegen der alten Deutung werden die Scheinspiralen hier als Zufallsbildungen beim Einrollen der anfangs bandförmigen Riesenchromosomen zu hohlzylindrischen Gebilden angesehen, eventuell als Folge einer leichten Verschiebung der Seitenränder der Bänder in entgegengesetzter Richtung vor ihrem Zusammenschluß.

b) Geschlechtschromosomen. Auf die Männchen beschränkt ist ein kleiner, total (α -)heterochromatischer Körper in den Kernen der Speicheldrüsenzellen, der keinerlei spezifische Paarungsbeziehungen aufweist und zweifellos das Y-Chromosom darstellt (Abb. 3a, 6b). Es handelt sich um ein rundes oder ovales Gebilde von 3—6 μ Durchmesser. Häufig läßt sich an ihm ein kleiner „Stiel“ entdecken, der in einen Faden ausläuft und, nicht weit verfolgbar, am nächstliegenden Riesenchromosom Anschluß zu finden scheint. Manchmal ist es einem der Autosomen an beliebiger Stelle seitlich „angeheftet“ oder mit dem „Knöpfchen“ abschnitt des Chromosoms 4 zu einer Einheit verschmolzen (Abb. 6a). Liegt das Y-Chromosom in der Nähe des Nukleolus, dann ist das „Stielchen“ fast immer zu dem im Nukleolus verankerten Heterochromatinblock des Chromosoms 4 hingelagert.

Das X-Chromosom kann in ♀- wie ♂-Larven, die vor der Verpuppung stehen, in Aussehen und Größe von Zelle zu Zelle und von Individuum zu Individuum variieren (vgl. Abb. 7 und 8). Die interindividuelle Variabilität hat sich in Zuchtversuchen als von der Aufzuchttemperatur der Larven abhängig erwiesen (s. S. 404). In verpuppungsreifen Individuen aus Zuchten, die bei optimalen Temperaturen und darüber (17—22° C)

gehalten worden sind, beträgt die Länge des X nicht, wie es den Verhältnissen in der Mitose entspräche, die Hälfte, sondern nur etwa $\frac{1}{8}$ oder noch weniger der Länge des Chromosoms 4 (Abb. 7b). Seine Breite variiert indessen zwischen der doppelten und 4fachen der Autosomen. In seinem Habitus ähnelt es dem X in den Speicheldrüsen von *P. fenestrata* (WOLF 1950, S. 154). In jungen, bei hohen Aufzuchttemperaturen auch noch in älteren bis verpuppungsreifen Larven erscheint es — zumindest abschnittsweise — blattartig flach; zarte, parallel verlaufende Linien deuten den Verlauf der „Querscheiben“ an (Abb. 3b, 5a, 7a, 10a).

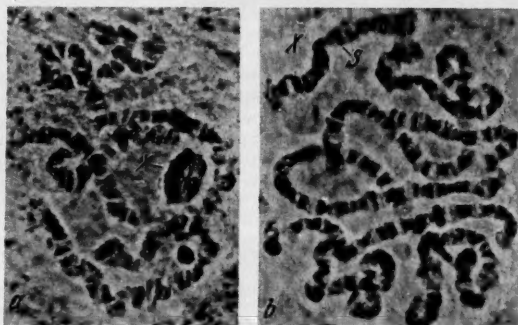


Abb. 5a u. b. Temperaturbedingte interindividuelle Variation der Größe und äußeren Struktur des X-Chromosoms in den Speicheldrüsenkernen weiblicher Larven (a, b). X-Chromosom unmittelbar vor oder nach der Verpuppung der Larven extrem „gestaucht“ und blattförmig (a) oder zylindrisch und weitgehend gestreckt (b) oder fast völlig gestreckt und normal gebaut (vgl. Abb. 8c), je nachdem die Larven bei 20–22° (a) bzw. 10–14° (b) oder 4–8° C (Abb. 8c) aufgezogen worden sind. Am X ein stark färbbarer von einem schwach färbbaren Abschnitt unterscheidbar, in b ein Bulbus (B, vgl. Abb. 8c) im erstgenannten und ein charakteristisches Sammelchromomer (S) im letztgenannten. 500 ×

In anderen Fällen, vor allem im haploiden Zustand (im ♂), tritt das X manchmal nur spurenhafte hervor und ist dann kaum aufzufinden (Abb. 6a) oder es bildet einen lediglich in 2 Areale verschiedener Färbbarkeit gegliederten granulären Körper (Abb. 3a).

Bei fast allen Gestaltstypen des X-Chromosoms — gleich, ob die Präparate mit Karminessigsäure oder nach FEULGEN gefärbt sind — läßt sich ein dunkler (anscheinend desoxyribonukleinsäure„reicher“) Abschnitt, der mehrere, besonders dicke „Scheiben“ einschließt, von einem zart getönten, schwach chromatischen (DNS„armen“) unterscheiden (Abb. 5a, 10a–c, 7a–c; vgl. S. 407–408). Zwischen beiden Abschnitten, von denen jeder ungefähr eine Hälfte des Chromosoms einnimmt, findet sich sehr häufig eine Einschnürung (E, Abb. 7b–d, 10d). Innerhalb des schwach gefärbten Chromosomenabschnittes, unweit der Einschnürung, tritt regelmäßig ein einzelnes, kräftiges Sammelchromomer hervor (S in Abb. 13a, d; erkennbar auch in Abb. 7a; vgl. ferner

Abb. 10e, 13e). Alle übrigen querscheibenartigen Strukturen des X-Chromosoms lassen sich in ihrer Stärke, Anordnung und Anzahl gewöhnlich nicht definieren.

Auch in der Mitose können vorübergehend Strukturunterschiede zwischen Autosomen und X auftreten. Sie äußern sich in Form einer Kontraktionsverzögerung des X gegenüber allen anderen Chromosomen in frühen bis mittleren Prophasestadien (Spermato- und Oogonien; Abb. 2a, d). In der späten Prophase sowie in der Metaphase besitzt das X stets den gleichen Kontraktionsgrad wie die Autosomen (Abb. 2c, f). Außerdem klingt die somatische Paarung der X-Chromosomen in der Prophase der Oogonien früher ab als in den Autosomen (Abb. 2d, e; s. auch WOLF 1950).

Beim ersten Studium der Mitose war die Kontraktionsverzögerung des X-Chromosoms übersehen worden (WOLF 1950, S. 154). Die frühere Angabe einer sogar vorausseilenden Verdichtung desselben in der Prophase der Spermatogonien muß korrigiert werden. Als heteropyknotisch während der Inter- und Prophasestadien der Spermatogonien hat sich nur das Y-, nicht aber das X-Chromosom erwiesen. Das wird an Kernen deutlich, in denen die gewöhnlich verschmolzenen Geschlechtschromosomen ausnahmsweise getrennt liegen. Unwiderrufen bleibt hingegen die vorzeitige Verdichtung des X-Chromosoms in den Prophasen der beiden Reifeteilungen im ♂.

2. Die temperaturbedingte Strukturvariabilität des X-Chromosoms

Unter normalen Zuchtbedingungen finden sich am X-Chromosom der Speicheldrüsenkerne nur geringe Abweichungen von den oben geschilderten Bauverhältnissen. Züchtet man aber die Larven bei niedrigeren Temperaturen als 17° C, dann ändert sich das Aussehen des X in einem unerwarteten Ausmaß. In Individuen aus Zuchten, die bei 10–14° C gehalten worden sind und sich dementsprechend langsamer entwickelt haben, erreicht es eine bedeutend größere Länge als bei 17° C, erscheint mehr walzen- als blattförmig und nähert sich manchmal in seiner äußeren Strukturierung streckenweise dem Habitus normal gebauter Abschnitte der Autosomen (Abb. 5b). Durch Aufzucht der Tiere bei 6–8° C und guten Ernährungs- und Lebensbedingungen¹ wird die Dauer der Larvalentwicklung auf mehr als das Doppelte gesteigert. Hierbei kann das X-Chromosom in verpuppungsreifen Larven und frisch verpuppten Tieren sogar auf eine vollkommen den mitotischen Verhältnissen entsprechende relative Länge gebracht werden, wobei es unter Hervortreten von rund 80 Querscheiben das Aussehen eines normalen Riesenchromosoms gewinnt (Abb. 8c). Das gleiche gilt für das X in männlichen Larven (Abb. 6). Mit diesen Veränderungen an den Riesenchromosomen sind makroskopische an den Larven und Imagines

¹ Hierunter wird insbesondere verstanden: reichliche, aber nicht übermäßige Bevölkerung, genügend feuchter, gut durchlüfteter und nicht säuernder Futterbrei. Diese Bedingungen waren in den Zuchten infolge schwer kontrollierbarer anderer Faktoren (Pilzbefall, Bakterienflora) nur gelegentlich erfüllt.

korreliert: Diese sind in „Kälte“-zuchten bedeutend größer als in „Wärme“-zuchten (vgl. S. 413).

Die echte Querscheibenstruktur aller Abschnitte kommt erst im völlig gestreckten X-Chromosom ganz zutage. Nur das oben (S. 403) genannte Sammelchromomer im schwächer färbbaren Abschnitt des noch ungestreckten X läßt sich über alle Strukturzustände hinweg

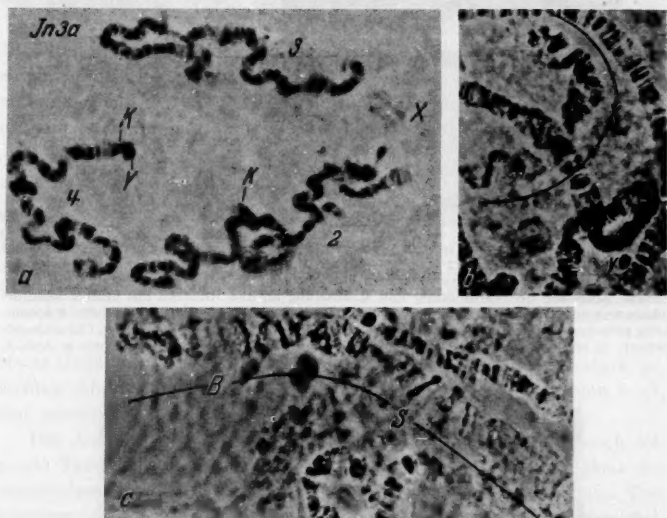


Abb. 6a—c. Temperaturbedingte interindividuelle Variation der Größe und äußeren Struktur des X-Chromosoms in den Speicheldrüsenkernen verpuppungsreifer männlicher Larven nach Aufzucht bei 20—22° (a), 10—14° (b) bzw. 4—8° C (c). X in a gegenüber den Autosomen bedeutend schwächer färbbar und kaum hervortretend, in b und c weitgehend bzw. stark gestreckt. Y-Chromosom in a und b mit abgebildet (in a mit dem heterochromatischen „Knöpfchen“-abschnitt des Chromosoms 4 verschmolzen). Ganzer Kern nur in a. In 3a große subterminale Inversion in Chromosom 3. B, S, K wie in Abb. 5. 570 × (a), 800 × (b, c)

verfolgen (S in Abb. 7f, 8a, b; s. auch Abb. 10e, g, h) und mit einer Querscheibengruppe des gestreckten Chromosoms identifizieren (Abb. 8c; vgl. auch Abb. 13d, e mit b und f). Gelegentlich glückt eine solche Zurückführung auf echte Querscheiben auch im Falle anderer streifenartiger Strukturen, besonders wenn das Chromosom in dem betreffenden Abschnitt von vornherein lamellär gebaut ist (vgl. Abb. 10e mit h). Die dicken Scheiben im stärker färbbaren Abschnitt des ungestreckten Chromosoms erweisen sich dann als Aggregate aus Einzelscheiben, in die sie später aufspalten. Gewöhnlich aber täuschen sie nur einen Chromomerenbau vor. Die echten Querscheiben treten bei den meisten

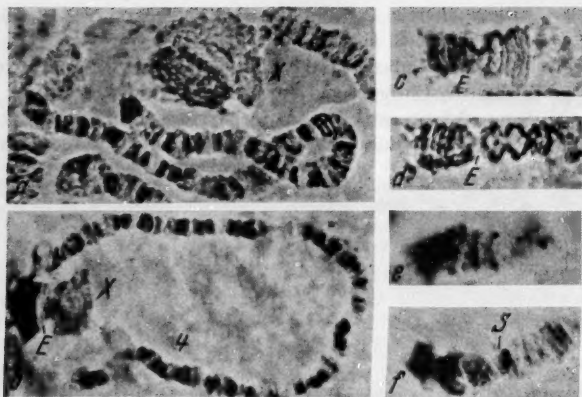


Abb. 7a—f. X-Chromosom in den Speicheldrüsenkernen verpuppungsreifer weiblicher Larven nach Aufzucht bei 22° (a), 17—20° (b, c), 14—17° C (d—f). In a und b ist zur Demonstration eines Längenverhältnisses von ungefähr 1:8 auch Chromosom 4 mit abgebildet. Einsetzen der Verdichtung und Kräuselung an den Rändern des primär bandförmigen Chromosoms in c und d; in e und f treten die echten Chromomeren leiterprossenartig zwischen den Scheinstrukturen des spiralig oder mäandrisch gewundenen Chromosoms hervor. E vorgetäuschte Einschnürung im „gestauchten“ X (vgl. S. 408); S wie in Abb. 5. 800 × (b, c), 1200 × (d—f) bzw. 1600 × (a)

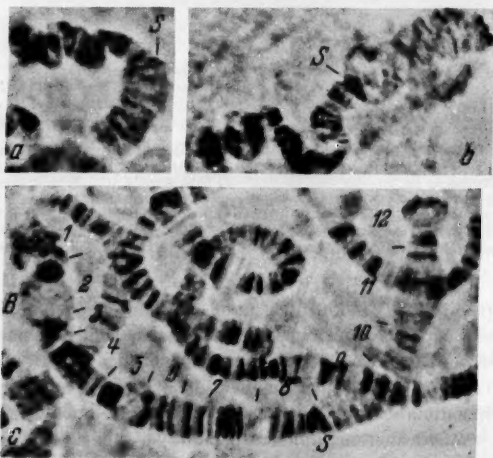


Abb. 8a—c. Fortgeschrittene (a, b) bis fast abgeschlossene Streckung (c) des X-Chromosoms in den Speicheldrüsenkernen verpuppungsreifer (a, b) bzw. frisch verpuppter (c) weiblicher Tiere nach Aufzucht bei 8—14° (a, b) und 4—8° C (c). B und S wie in Abb. 5. Provisorische Einteilung des Chromosoms in 12 Abschnitte (vgl. Abb. 9). 1000 × (a, b) bzw. 1200 × (c)

in Streckung befindlichen X-Chromosomen als kurze, senkrecht zu den Pseudochromomeren verlaufende Streifen hervor, und das um so deutlicher, je mehr das X gestreckt ist (Abb. 7e, f, 8a). Charakteristisch für andere Abschnitte in diesem Stadium ist ein mäandrischer oder schräg zur Hauptachse gerichteter Verlauf von Strukturen, die Ähnlichkeit mit zwei umeinander gewundenen und sich überkreuzenden Spiralen haben (Abb. 6b, 7f, 8b).

Die Karte des gestreckten X-Chromosoms wurde provisorisch in 12 Abschnitte eingeteilt (Abb. 8c, 9). Als Abschnittsgrenzen wurden einige auffallende achromatische Regionen gewählt. Besondere Merkmale sind der dicke Bulbus (*B*) am proximalen Ende (Abschnitte 2 und 3) und die auch im gestauchten X erkennbare Querscheibengruppe (*S*)



Abb. 9. Strukturkarte des X-Chromosoms (vgl. S. 407). *B*, *S* wie in Abb. 5 (1200 ×)

etwas distal der Mitte des Chromosoms (Abschnitt 8). Dem stark gefärbten Abschnitt des gestauchten X entsprechen die Regionen 1—7, dem schwach gefärbten die Regionen 8—12.

Die Analyse des Streckungsprozesses ergab im einzelnen noch folgende Tatsachen: Ganz allgemein wurde eine relative Häufigkeit des einebig-lamellären Bautyps in frühen, dagegen dessen selteneres Vorkommen in späten Stadien der Streckung festgestellt. In den Speicheldrüsenkernen ein und desselben Individuums wurden vorzugsweise X-Chromosomen vom gleichen Bautyp gefunden. Entweder waren sie fast alle folienartig oder alle zylindrisch gebaut, oder sie stellten eine Kombination beider Bauweisen dar. Die Massierung der Fibrillen erfolgt zuerst an den Rändern des primär lamellären X (Abb. 7c, d). Die von ihr hervorgerufene mäandrische Kräuselung herrscht in der stärker färbbaren Hälfte des X-Chromosoms vor, während im schwächer färbbaren Abschnitt die von vornherein bestehende gleichmäßige, bandartige Fibrillenordnung oft erhalten bleibt (Abb. 10e). Die hier beobachteten Querscheiben werden nicht durch Faltenbildung hervorgerufen, sondern sind Sammel-Querscheiben, die bei weiterer Streckung des Chromosoms in Einzelscheiben aufspalten. Im allgemeinen beeinflussen aber auch im schwächer färbbaren Abschnitt bis in späte Stadien der Streckung hinein Scheinstrukturen sein äußeres Bild. Sie treten in Gestalt der verdickten Bänder des gekräuselten, gelegentlich wohl auch tordierten Bandes hervor (Abb. 7c—f). Hierbei können im stärker färbbaren Abschnitt

schon die echten Querscheiben klar erkennbar geworden sein (besonders deutlich in Abb. 8b). Wahrscheinlich hängt das mit einem relativ frühen Kompaktwerden des Fibrillenbündels im letztgenannten Abschnitt zusammen. Ihm gegenüber ist der schwächer färbare Abschnitt, der sich im Kälteversuch langsamer „normalisiert“, als stärker allozyklisch zu betrachten. An der größeren Breite und schwächeren Färbbarkeit des Chromosoms in einigen Regionen kann man erkennen, wo das X am stärksten allozyklisch ist (z. B. im Bulbusabschnitt und Abschnitt 9 und 10 der Strukturkarte).

Es hat fast den Anschein, als enthielten der stärker färbare gegenüber dem schwächer färbaren Abschnitt im ungestreckten Chromosom relativ mehr chromatische Bestandteile als im gestreckten (vgl. Abb. 7a mit 8c sowie 13d, e mit b und f). Die Anzahlen beobachteter Scheiben in beiden Abschnitten sind im maximal gestreckten X kaum verschieden. Ob mit dem Streckungsvorgang tatsächlich eine Verschiebung des DNS/Protein-Verhältnisses zwischen beiden Abschnitten eintritt, muß aber erst mikrospektrophotometrisch ausgemessen werden. Nicht unberechtigt erscheint die Vermutung einer Verschiebung des DNS-Verhältnisses zwischen X-Chromosom und Autosomen, da zwischen beiden in „Wärme“ zuchten sehr häufig unerwartet starke Färbungsunterschiede auftreten (besonders auffällig bei den ♂♂, s. Abb. 6a; vgl. auch Abb. 13g).

Im Bereich der Einschnürung, die fast nur im stark gestauchten X-Chromosom deutlich ist, muß von vornherein, also in allen Strukturzuständen, eine enge Bündelung der Fibrillen vorliegen — oder es ist hier ein ganz kurzer Chromosomenabschnitt, im Gegensatz zu dem Rest des Chromosoms, stets maximal gestreckt: Bei fortschreitender Streckung der übrigen Teile des Chromosoms erscheint dieser Abschnitt immer weniger „eingeschnürt“ (vgl. Abb. 7b—d mit 8c sowie 10d mit g, h). Wahrscheinlich sind auch leichte Torsionsbewegungen, zumindest kurzer Randabschnitte, in den Streckungsvorgang des X-Chromosoms eingeschaltet. Manche Bilder lassen diese Vermutung zu (Abb. 6b, 7c—f).

Am gestreckten X fällt das Auseinanderspreizen der Partner — häufig auch der Partnerhälften — am Ende des stärker färbaren Abschnittes auf (Abb. 8c, 9, 13f). Das zeigt sich schon im gestauchten X nicht selten durch das Sichtbarwerden zweier kleiner „Zipfel“ an (Abb. 3b, 7b, c). Man geht sicherlich nicht fehl, dieses Ende als das proximale anzusehen: 1. Ist ein vergleichbares Verhalten manchmal am Kinetochorenabschnitt des mitotischen X zu beobachten, wenn in der Prophase die Trennung der somatisch gepaarten Partner einsetzt; 2. befindet sich in unmittelbarer Nähe der Bulbus-Abschnitt, der, wie die Kinetochorregionen der Autosomen, aus kompakt- und diffusheterochromatischen Anteilen aufgebaut ist.

Ohne eine genaue Untersuchung des Entwicklungsganges der verschiedenen Strukturtypen des X-Chromosoms hätte die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden können, daß die verschiedenen, in gleich

alten (verpuppungsreifen) Larven erfaßten Streckungszustände gar nicht. Glieder einer einzigen morphogenetischen Reihe, sondern Endphasen von Entwicklungsprozessen sind, die von vornherein unterschiedlich ablaufen. Es wurden daher auch jüngere Larven (ab 4 mm Länge) aus Kulturen verschiedener Temperatur in die Untersuchung einbezogen. In ihren Speicheldrüsenkernen ist das X-Chromosom gegenüber den normal strukturierten (d. h. zylindrischen) und stark gestreckten (allerdings

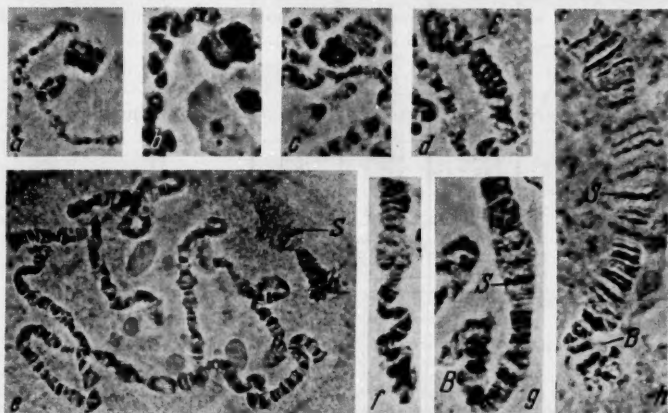


Abb. 10a—h. Verschieden weit fortgeschrittene Entwicklungszustände des X-Chromosoms in 4 mm langen (a), 5—6 (b, c), 7—9 (d, e) und 10—11 (f, g) mm langen Larven und in einer verpuppungsreifen (h), alle aus einer 8°C-Zucht. Das X ist in frühen Stadien seiner Morphogenese (a, b) vorwiegend blattförmig, in mittleren Stadien (c—e) mehr oder weniger gestreckt und kräuselig-mäandrisch, in späteren (f—h) annähernd massiv-zylindrisch gebaut; im schwächer färbaren Abschnitt kann der primär laisellär-bandförmige Bau streckenweise lange erhalten bleiben (e, h). E, B und S wie in Abb. 7 bzw. 5. Vollständiger Kern nur in e. 400 × (b, c, e—g), 600 × (a), 800 × (d, h)

häufig noch spiralisierten) Autosomen noch viel „zu kurz“ — oft kürzer als breit — und zwar in 4 mm langen Larven bei allen Aufzuchttemperaturen (Abb. 10a). In etwas längeren (5—6 mm) Larven aus 8°C-Zuchten wird das Querscheibenmuster des X noch ganz durch die extreme „mäandrische“ Fältelung und Stauchung (s. weiter unten) maskiert (Abb. 10b, c). Erst bei 7—9 mm langen Larven macht sich der Kälteeffekt bemerkbar. X-Chromosomen solcher Tiere, die bei 4—8°C gehalten wurden, strecken sich, und dabei tritt das Querscheibenmuster klar zutage; gleichzeitig schwindet die mäandrische Fältelung (Abb. 10d—h).

Ob in dem Zeitraum der präpupalen Entwicklung, in dem Kälte „appliziert“ wird, die Embryogenese eingeschlossen ist oder nicht, hat sich bei oberflächlicher Untersuchung (ohne exakte Messungen an Kern und X-Chromosom) als gleichgültig erwiesen. Einige Anzeichen sind gefunden worden, die dafür sprechen, daß

Tabelle 1. Längenverhältnisse zwischen Chromosom 4 und dem X-Chromosom einzelner Speicheldrüsenkerne bei (47) verpuppungsreifen Larven nach Aufzucht bei verschiedenen Temperaturen

Je Larve wurden ein oder mehrere Kerne zur Messung herangezogen (vgl. Abb. 11)

Aufzucht- temperatur	Länge des X-Chromo- soms in μ	Länge des Chromo- som 4 in μ	Längen- verhältnis Chromo- som 4/X- Chromo- som	Durchschnittslängenverhältnis		
				X-Chro- mosom	Chromo- som 4	Chromo- som 4/X- Chromo- som
♀♀	17—22° C	8,5	73,1	14,1	106,1	7,7
		9,6	81,5			
		11,2	85,7			
		11,5	85,5			
		12,8	96,2			
		12,9	125,0			
		13,6	105,4			
		16,3	121,5			
		18,3	127,4			
		20,3	142,0			
		20,4	124,3			
	10—17° C	20,8	151,3	37,9	168,0	4,8
		22,4	164,8			
		29,7	141,9			
		29,7	183,8			
		31,5	148,6			
		34,9	169,9			
		40,8	164,5			
		44,1	164,4			
		44,6	195,9			
		45,4	182,4			
		47,8	162,0			
		50,0	195,9			
		50,6	157,0			
	4—10° C	54,0	175,7	78,5	194,5	2,5
		62,5	189,0			
		65,9	204,2			
		73,1	196,5			
		75,4	192,0			
		75,6	202,6			
		84,3	191,5			
		84,4	167,0			
		87,7	170,1			
		89,8	214,0			
♂♂	17—22° C	8,1	109,0	11,4	132,5	12,0
		11,5	126,0			
		12,3	139,0			
		13,8	166,0			
	10—17° C	16,2	135,1	17,9	148,7	8,4
		16,9	151,3			
		17,8	146,0			
		20,5	162,1			
	4—10° C	51,7	232,0	57,1	215,0	3,8
		55,2	206,0			
		64,8	208,0			

die Körpergröße des Muttertieres und die Größe der Eier von Einfluß sind. Diese Angaben bedürfen noch einer genaueren Nachprüfung.

Im Laufe seiner Morphogenese in Larven aus „Kälte“zuchten zeigen sich am X-Chromosom also die gleichen, vielfältigen Formcharaktere wie in verpuppungsreifen Larven unter verschiedenen Aufzuchttemperaturen. Sämtliche Strukturzustände, in denen das X-Chromosom angetroffen wird, dürfen im großen und ganzen in eine morphogenetische Reihe eingeordnet werden, die von einer nur schwachen Ausprägung und granulären Strukturierung des Chromosoms über mehr oder weniger

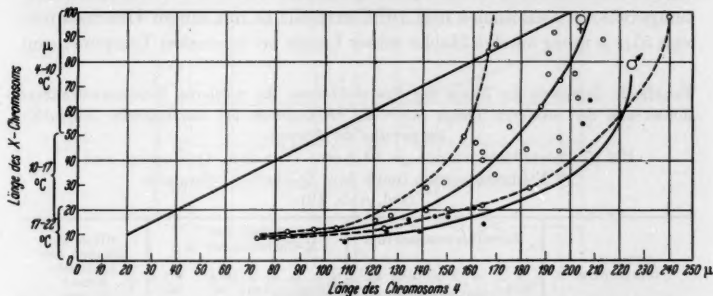


Abb. 11. Graphische Wiedergabe der in Tabelle 1 zusammengestellten Längenverhältnisse zwischen Chromosom 4 (als Vertreter der Autosomen) und dem X-Chromosom in den Speicheldrüsenkernen verpuppungsreifer Larven bei verschiedenen Aufzuchttemperaturen. Bei hohen Aufzuchttemperaturen (17–22° C) beträgt das Längenverhältnis Chromosom 4/X bei der Verpuppung der Larven fast 8:1 bei den ♀♀ (Kreise) bzw. 12:1 bei den ♂♂ (Punkte) anstatt des mitotischen von 2:1, das mit der Geraden wiedergegeben ist. Bei tieferen Aufzuchttemperaturen erfährt der Streckungsvorgang am X gegenüber den Autosomen nach anfänglicher Hemmung eine ausgleichende Beschleunigung. Ihr zufolge kann in „günstigen“ Fällen bei der Verpuppung ein Längenverhältnis hergestellt sein (2,5:1 bei den ♀♀ nach Aufzucht bei 4° C), das nahezu dem mitotischen entspricht. Die gestrichelten Begrenzungen des Variationsbereiches bei den ♀♀ zeigen die Streuung der Längenverhältnisswerte an (die scheinbare Zunahme der Streuung hängt nur mit der Zunahme der absoluten Länge zusammen, prozentual bleibt sie ungefähr die gleiche)

„gestauchte“ Formen bis zu einem typischen Aufbau aus Querscheiben führt. Alle strukturellen Zwischenstufen erweisen sich als Phasen eines Entwicklungsablaufes, der durch keinerlei Fragmentations- und Umgruppierungsprozesse im Sinne der von KOSSWIG und SENGÜN (1947a) vertretenen und von BAUER (1952), BAUER und BEERMANN (1952) und BEERMANN (1950) widerlegten Hypothese unterbrochen ist.

Daß Aufzuchttemperaturen unter 17° C Vorbedingung für die Streckung des X-Chromosoms sind, durch die es in das „richtige“ Längenverhältnis zu den Autosomen gelangt, geht aus dem Vergleich der relativen Längen des X-Chromosoms und des Chromosoms 4 aus gleichen Speicheldrüsenkernen verpuppungsreifer Larven hervor, die bei verschiedenen Temperaturen aufgezogen worden waren (Tabelle 1). Beide Chromosomen nehmen mit sinkender Aufzuchttemperatur an Länge zu, das X-Chromosom aber stärker als Chromosom 4. Bei optimaler und

höherer Temperatur (17—22° C) ergeben sich Durchschnittslängenergebnisse von 14,1 μ für das X und 106,1 μ für Chromosom 4 in ♀♀, bei sehr niedrigen Temperaturen (4—10° C) 78,5 μ bzw. 194,5 μ . Das Chromosom 4 erreicht bei tiefen Temperaturen zwar annähernd das Doppelte, das X-Chromosom aber fast das 6fache der bei 17—22° C beobachteten Länge. Das Längenverhältnis zwischen beiden Chromosomen sinkt also von rund 8 auf 2,5 (Abb. 11).

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den ♂♂, wo das X-Chromosom aber durchschnittlich viel kürzer ist als bei den ♀♀. Bei Aufzuchtstemperaturen zwischen 4 und 10° C erreicht es mit einem Durchschnitt von 57,1 μ mehr als das 5fache seiner Länge bei normalen Temperaturen

Tabelle 2. Zunahme der Länge der Speicheldrüsen, des mittleren Durchmessers ihrer Kerne und der mittleren Länge ihrer X-Chromosomen bei abnehmender Aufzuchttemperatur der Larven

Bei 27 Individuen wurden je 10 Kerne (vor dem Quetschen) und 10 X-Chromosomen (nach dem Quetschen) gemessen (vgl. Abb. 12)

Aufzucht-temperatur	Kerndurchmesser in μ			Länge des X-Chromosoms in μ			Mittel der Längen der Speicheldrüsen in mm	
	Mittel \pm 3 m	ma-xi-mum	mi-ni-mum	Mittel \pm 3 m	ma-xi-mum	mi-ni-mum		
♀♀	17—22° C	37,3 \pm 0,6	44,6	32,3	13,5 \pm 0,7	16,7	10,3	0,95
		38,5 \pm 0,5	43,1	32,3	18,9 \pm 1,1	23,0	13,5	1,04
		41,8 \pm 0,8	53,8	53,4	13,2 \pm 0,8	17,6	9,5	0,95
		44,2 \pm 0,9	52,3	32,3	16,6 \pm 0,9	21,8	14,1	1,01
		47,0 \pm 0,6	55,4	43,1	16,3 \pm 0,8	20,5	14,1	1,17
	10—17° C	48,0 \pm 0,8	56,9	43,1	22,4 \pm 0,6	27,0	20,3	1,43
		52,5 \pm 0,6	60,0	46,2	29,7 \pm 1,3	39,2	25,7	1,33
		52,8 \pm 0,7	60,0	46,2	32,8 \pm 1,5	40,6	27,0	1,52
		53,8 \pm 0,9	69,3	46,2	20,8 \pm 1,3	27,0	14,9	1,26
		55,1 \pm 0,7	64,6	49,2	34,9 \pm 2,0	47,3	26,0	1,47
		55,8 \pm 0,5	60,0	50,8	31,5 \pm 1,2	37,8	24,3	1,53
		57,6 \pm 0,8	64,6	49,2	37,5 \pm 2,1	54,1	27,0	1,54
	8—10° C	62,8 \pm 0,5	70,8	58,5	62,7 \pm 2,0	70,2	50,0	2,10
		64,6 \pm 0,9	75,4	52,3	62,5 \pm 2,1	75,6	54,0	2,18
		65,8 \pm 1,2	76,9	50,8	47,8 \pm 2,1	56,7	33,8	2,21
		70,6 \pm 1,5	90,7	57,0	45,4 \pm 2,5	59,5	35,1	1,67
		72,0 \pm 1,4	86,2	55,3	43,8 \pm 2,2	56,7	33,8	2,09
		72,2 \pm 1,3	86,2	58,5	45,9 \pm 3,3	64,8	24,3	1,95
♂♂	17—22° C	40,5 \pm 0,8	50,8	32,3	10,5 \pm 1,1	14,1	9,0	1,09
		45,1 \pm 0,7	50,7	37,0	12,8 \pm 0,6	16,2	10,8	0,96
		48,3 \pm 0,8	58,5	40,0	13,8 \pm 0,5	16,2	9,5	1,26
	10—17° C	49,9 \pm 0,4	55,4	47,7	16,9 \pm 0,9	21,6	13,5	1,16
		54,0 \pm 0,7	61,5	46,2	20,5 \pm 0,7	23,0	16,2	1,32
		54,2 \pm 1,0	66,2	43,1	17,8 \pm 0,7	23,0	14,9	1,67
		54,3 \pm 0,3	56,9	50,8	16,6 \pm 0,9	21,6	10,8	1,56
		56,6 \pm 0,6	61,5	47,7	17,7 \pm 0,9	23,0	13,5	1,36
		57,8 \pm 0,7	66,2	52,3	18,6 \pm 0,7	23,0	14,9	1,60

(11,4 μ), aber nur etwa $\frac{2}{3}$ der Länge, die das diploide X in den ♀♀ derselben Zuchten gewinnt. Könnte man den Zeitpunkt der Verpuppung noch weiter hinausschieben, so würde die Streckung sich wohl noch weiter fortsetzen.

In den Längenunterschieden zwischen dem uni- und dem bivalenten polytären X zeigt sich die Abhängigkeit des Streckungsgrades von der Anzahl der Einzelfibrillen, d. h. vom Polytäniegrad. Tatsächlich ließ sich auch ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen dem Kerndurchmesser, der als Maß für den Polytäniegrad herangezogen wurde, und

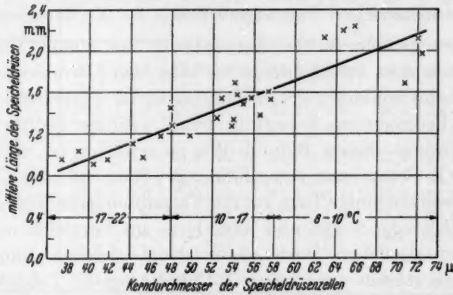


Abb. 12. Zunahme der mittleren Länge der Speicheldrüsen und des mittleren Durchmessers ihrer Kerne mit abnehmender Aufzuchttemperatur bei verpuppungsreifen Individuen (vgl. Tabelle 2)

der Länge des X-Chromosoms feststellen. Mit steigendem Kerndurchmesser nimmt allgemein die Länge des X-Chromosoms zu (Tabelle 2).

Auch Anhaltspunkte für eine positive Korrelation zwischen dem temperaturabhängigen Polytäniegrad der Kerne (und mit ihm auch zwischen den mittleren Längen des X-Chromosoms) einerseits und den erreichten Dimensionen der Larven und Imagines andererseits haben sich ergeben. Eine Verkürzung und Verbreiterung des Larvenkörpers in den letzten Tagen vor der Verpuppung hat sehr schwankende Zahlenwerte bezüglich Körperlänge zur Folge, so daß auf eine genaue Analyse dieser Beziehung verzichtet werden mußte. Als Maß für erreichte Körpergröße wurde die Länge der Speicheldrüsen herangezogen (Tabelle 2, Abb. 12). Mit sinkender Aufzuchttemperatur nehmen ganz allgemein die Länge der Speicheldrüsen, die Durchmesser ihrer Kerne und die Länge des X-Chromosoms in ihnen zu. Aufzucht bei 8–10 statt 17 bis 22° C hat in verpuppungsreifen Larven eine rund doppelte Länge der Speicheldrüsen, eine Erhöhung des mittleren Kerndurchmessers auf etwa das 1,5fache und eine Streckung des X-Chromosoms auf mehr als das 3fache der Länge, die es im ungestreckten Zustand besitzt, zur Folge gehabt. Die an einigen ♂♂ gewonnenen Daten lassen dort einen ähnlichen Sachverhalt erkennen.

Die Larven-Entwicklungsdauer an sich, die infolge von Zufälligkeiten auch bei gleicher Aufzuchttemperatur unter Geschwistertieren sehr variieren kann (s. S. 398), hat auf den Polytäniegrad keinen Einfluß. Messungen des Durchmessers von Speicheldrüsenkernen bei einer (allerdings keine Sicherung gestattenden) Anzahl frischverpuppter Individuen, die aus ein und demselben Gelege¹ hervorgegangen und unter gleichmäßigen Bedingungen (bei 8° C auf Gaze mit Hefelösung) gehalten worden waren, führten zu kaum verschiedenen Werten. Es ließ sich auch keine Zunahme der mittleren Länge der Speicheldrüsen und der X-Chromosomen mit der Larvalentwicklungsdauer (sie lag zwischen 58 und 75 Tagen) feststellen.

3. Gewebespezifische Unterschiede in Streckungsgrad und somatischem Paarungsverhalten des X-Chromosoms

BEERMANN (1952a, S. 188) konstatierte bei einem Vergleich der Riesenchromosomen verschiedener Gewebe von *Chironomus*, „daß ihr Strukturzustand unabhängig vom Polytäniegrad weitgehend auch durch die inneren Bedingungen beeinflusst wird“. Einige Beobachtungen an *Phryne* bestätigen diesen Befund. Wie zu erwarten ist, treten hier besonders am X-Chromosom augenfällige gewebespezifische Unterschiede hervor. So besitzen einige Tage vor der Verpuppung die Kerne der großen Mitteldarmzellen (s. S. 398 und Abb. 1) — im Vergleich mit Speicheldrüsenkernen ähnlichen Durchmessers vom gleichen Individuum — ein bedeutend stärker gestrecktes X-Chromosom (s. Tabelle 3 und vgl. Abb. 13b mit a, auch f mit d). In kleineren Zellen des Mitteldarms (Abb. 13e) und in den Kernen der Malpighi-Gefäße (Abb. 13c) desselben Tieres ist das X dagegen noch stark „gestaucht“. Äußerlich vom gleichen Habitus wie in den Speicheldrüsen, ist es dort (je nach dem Polytäniegrad der betreffenden Kerne) etwas bis sehr viel kleiner. Wie in den Speicheldrüsenkernen, kann das X-Chromosom aber auch in den Zellen des großkernigen Mitteldarms bezüglich Streckungsgrad und Färbbarkeit den Autosomen weit nachstehen. Das gilt für jüngere Larvenstadien der ♀♀, für mittlere und auch ältere der ♂♂. Besonders bei letzteren erscheint das X-Chromosom, selbst nach Aufzucht der Larven bei mäßigen Temperaturen (14—17°), gegenüber den Autosomen relativ „zu arm an Substanz“ (Abb. 13g).

Auch an den Autosomen und am Nukleolus treten gewebespezifische Unterschiede hervor. Letztgenannter ist im großkernigen Mitteldarm um ein Vielfaches kleiner als in den Kernen der Speicheldrüsen (vgl. Abb. 13g und 14d mit 3a, 4b). Das Chromomerenmuster in den Autosomen tritt klarer hervor, und diese sind bei ungefähr derselben Breite bedeutend länger als in den Speicheldrüsen (auf die Feststellung von Breiten-Längen-Verhältnissen, wie sie BEERMANN 1952a, S. 144,

¹ Die Eier eines Geleges werden bei *Phryne* in der Regel innerhalb weniger (bis 10) Minuten, abgelegt; die aus ihnen hervorgehenden Larven haben praktisch das gleiche Alter.

Tabelle 3. Abhängigkeit des Streckungsgrades des X-Chromosoms von Gewebe und von der Aufzuchttemperatur der Larven

Von 14 Individuen (11 ♀♀, 3 ♂♂) wurden je 10 Chromosomen aus den Speicheldrüsen- und den großen Mitteldarmzellen gemessen. Bei 6 Tieren wurde außerdem das Verhältnis der mittleren Kerndurchmesser zwischen beiden Geweben (nahezu 1:1) festgestellt.

Aufzuchttemperatur		Länge des X-Chromosoms in μ						Verhältnis der mittleren Längen des X-Chromosoms Speicheldrüsenzellen/Mitteldarmzellen
		Speicheldrüsen			Mitteldarm			
		Mittel \pm 3 m	maximum	minimum	Mittel \pm 3 m	maximum	minimum	
♀♀	17—22° C	13,2 \pm 0,8	17,6	9,5	38,5 \pm 3,5	58,1	20,3	0,34
		13,6 \pm 0,4	16,7	11,5	37,3 \pm 3,2	45,9	31,1	0,37
		18,9 \pm 1,1	23,0	13,5	42,2 \pm 1,9	54,0	32,4	0,45
		20,3 \pm 0,9	25,7	14,9	47,3 \pm 1,9	58,2	33,8	0,43
	10—17° C	20,4 \pm 0,5	24,3	18,9	54,7 \pm 2,2	63,5	43,2	0,37
		20,8 \pm 1,3	27,0	14,9	54,7 \pm 3,2	63,5	41,8	0,38
		22,4 \pm 0,6	27,0	20,3	67,3 \pm 3,1	87,8	51,3	0,33
		31,5 \pm 1,2	37,8	24,3	67,4 \pm 1,5	77,0	60,8	0,47
		34,9 \pm 2,0	47,3	26,0	63,5 \pm 1,7	72,9	54,0	0,55
	37,5 \pm 2,1	54,1	27,0	69,6 \pm 5,5	101,4	40,6	0,53	
4—10° C	45,4 \pm 2,5	59,5	35,1	91,5 \pm 4,1	108,0	74,4	0,49	
♂♂	10—17° C	16,5 \pm 1,0	23,0	10,8	24,3 \pm 1,4	27,1	20,3	0,69
		17,7 \pm 1,4	27,7	12,2	37,5 \pm 1,5	44,6	29,7	0,47
		17,8 \pm 0,7	23,0	14,9	44,6 \pm 4,1	56,8	36,5	0,40
Aufzuchttemperatur		Kerndurchmesser in μ						Verhältnis des mittleren Kerndurchmessers Speicheldrüsenzellen/Mitteldarmzellen
		Speicheldrüsen			Mitteldarm			
		Mittel \pm 3 m	maximum	minimum	Mittel \pm 3 m	maximum	minimum	
♀♀	17—22° C	—	—	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	—
	10—17° C	53,8 \pm 0,9	69,5	46,0	47,3 \pm 0,5	52,5	41,5	1,14
		48,0 \pm 0,8	57,0	43,0	45,8 \pm 1,0	54,0	35,5	1,05
		55,8 \pm 0,5	60,0	51,0	56,8 \pm 0,7	63,0	49,0	0,98
		55,1 \pm 0,7	61,5	49,0	52,6 \pm 0,5	57,0	46,0	1,05
		57,6 \pm 0,8	64,5	49,0	51,4 \pm 0,5	52,5	37,0	1,12
	4—10° C	—	—	—	—	—	—	—
♂♂	10—17° C	41,2 \pm 0,6	52,3	38,5	40,0 \pm 0,5	44,5	34,0	1,04
		—	—	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	—

für die Riesenchromosomen von *Chironomus* vorgelegt hat, wurde verzichtet). Der Beobachter gewinnt den Eindruck, als wäre die Bündelung

der Fibrillen in den großen Mitteldarmzellen „straffer“ und, im Zusammenhang damit, die Streckung weiter vorangetrieben (vgl. Abb. 13 b mit a). Der Bulbus am proximalen Ende des X-Chromosoms tritt hier kaum oder überhaupt nicht mehr als Verbreiterung hervor (B in Abb. 13 f, b).

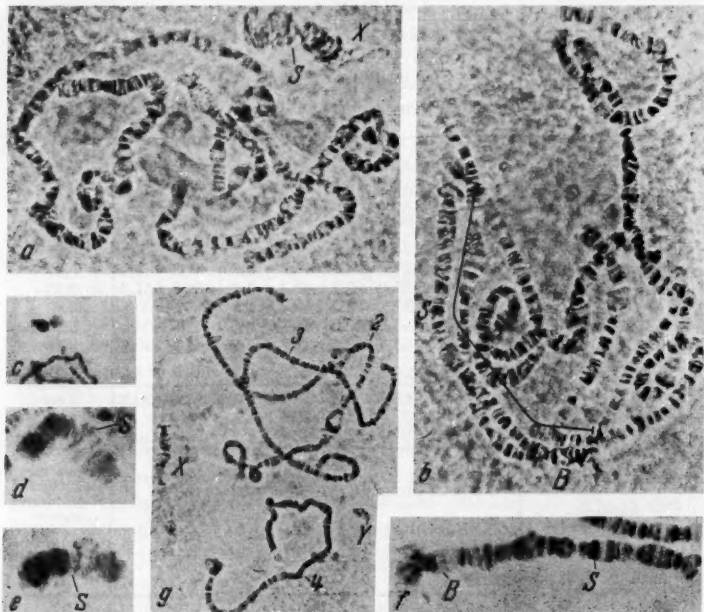


Abb. 13 a—g. Gewebespezifisch bedingte (vom Polytäniegrad unabhängige) Unterschiede im Streckungsgrad des X-Chromosoms weiblicher (a—f) bzw. männlicher (g) Larven wenige Tage vor der Verpuppung (nur g aus einem mittleren Larvenstadium). Kerne aus verschiedenen Geweben und von sehr unterschiedlichem Polytäniegrad (vgl. Abb. 1) können trotzdem ein sehr ähnlich gebautes, nämlich „gestauchtes“ X-Chromosom aufweisen (a, d Speicheldrüsen; c Malpighigefäße; b, f großkerniger, e kleinkerniger Mitteldarm). Andererseits können gewebeverschiedene Kerne von nahezu gleichem Polytäniegrad sehr verschieden stark gestreckt und, demzufolge, äußerlich voneinander sehr abweichend strukturierte X-Chromosomen aufweisen (vgl. a mit b und d mit f; s. auch Tabelle 4). X-Chromosom in b maximal gestreckt, in g relativ schwächer gefärbt als die Autosomen. a und b aus demselben Individuum, ebenso c—f. B, S wie in Abb. 5. Vollständige Kerne nur in a, b und g. 370 × (g), 550 × (a, b) und 670 × (c—f)

In Übereinstimmung mit BEERMANN'S Befund einer Gewebespezifität des Streckungszustandes der 4 Riesenchromosomen von *Chironomus* können alle beobachteten intraindividuellen Strukturabwandlungen des X-Chromosoms von *Phryne* als Unterschiede in seinem Streckungsgrad, d. h. als physiologisch bedingte Modifikationen der gleichen Art,

wie die exogen in den Speicheldrüsen verursachten, gedeutet werden. Ganz allgemein kann gesagt werden, daß der Streckungszustand der Riesenchromosomen bzw. ihrer einzelnen Abschnitte unter der Kontrolle folgender Faktoren steht: a) Eines in der genetischen Struktur selbst gelegenen Faktors, der einen Normalverlauf oder eine leichte bzw. starke Verzögerung der Streckung bedingt (Allozykliegrad); b) des Zytoplasmas (Gewebespezifität); c) des Polytäniegrades (Valenz beim

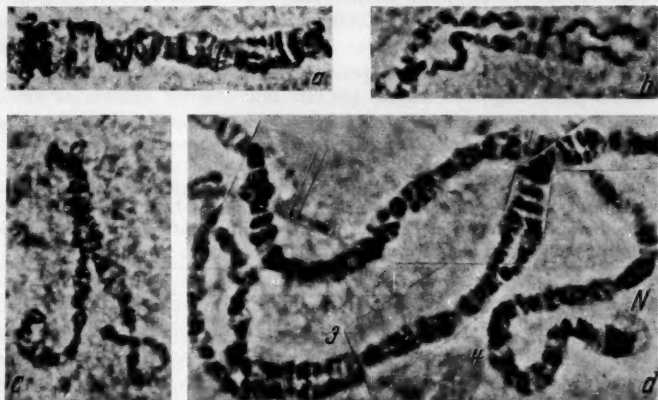


Abb. 14a—d. Abschnittsweise bis totale Nichtpaarung beim X-Chromosom (b, c) — selten auch bei den Autosomen (z. B. Chromosom 3 in d) — in den großkernigen Mitteldarmzellen zu Beginn ihrer Degeneration (vgl. S. 417—419). a, b aus demselben Individuum. N Nukleolus. (800 ×)

X-Chromosom, Kerndurchmesser bzw. die ihn beeinflussenden Außenfaktoren: Ernährung, Temperatur u. a.).

Eine weitere Feststellung liegt noch bezüglich des Paarungsverhaltens des X-Chromosoms in den großen Mitteldarmzellen vor. Bei Larven, die bei tieferer als der optimalen Temperatur von 17°C aufgezogen worden waren, fanden sich einzelne Mitteldarmzellen, in denen die Homologen des X-Chromosoms abschnittsweise, gelegentlich sogar vollständig, ungepaart waren (Abb. 14b, c). In rund 60 Kernen aus sechs untersuchten Larven von Zuchten in 17—22°C wurde dagegen kein Fall von partieller oder totaler Asynapsis des polytären X in den großen Mitteldarmzellen vor dem Einsetzen ihrer Degeneration festgestellt (abgesehen nur von der geringfügigen Partnertrennung am proximalen Ende, s. S. 408).

Drei Fakten traten bei dieser Beobachtung einer Gewebespezifität der somatischen Paarung hervor: a) Die Erscheinung erwies sich als weitgehend auf die X-Chromosomen beschränkt — Nichtpaarung wurde

nur ausnahmsweise auch bei den Autosomen festgestellt (Abb. 14d); b) innerhalb des X-Chromosoms wurde Nichtpaarung vorzugsweise im „stärker allozyklischen“ Abschnitt beobachtet (vgl. S. 408; eine genaue Analyse der einzelnen Abschnitte des X auf Paarungsfrequenz steht noch aus); c) die Asynapsis des X wurde relativ selten bei Larven entdeckt, in denen das großkernige Mitteldarmgewebe noch „intakt“ war und die Chromosomen noch keine Spuren einer Karyolyse, die etwa 3 Tage vor der Verpuppung eintritt, aufwiesen (Abb. 13b, f); hingegen erwiesen sich rund 20% der X-Chromosomen des in Rede stehenden Gewebes als nur partiell oder gar nicht gepaart, wenn in vielen seiner Kerne klare Anzeichen der Degeneration erkennbar waren (Tabelle 4).

Tabelle 4. Paarungszustand und Länge der X-Chromosomen in den hochpolytären Kernen des Mitteldarms während ihrer Degeneration

Von insgesamt 200 gemessenen X-Chromosomen stammen 100 aus (11) Larven, in denen noch kein Kern des betreffenden Mitteldarmabschnittes Anzeichen der Degeneration zeigt (a), 100 aus (ebenfalls 11) Larven, in denen sich bereits viele Kerne dieses Abschnittes im Zustand der Degeneration befinden (b). Aufzuchtstemperaturen der Larven zwischen 12 und 16° C.

Prozentsatz der unvollständig oder nicht gepaarten X-Chromosomen	Durchschnittslängen der X-Chromosomen in μ								
	alle			vollständig gepaarte			unvollständig oder nicht gepaarte		
	Mittel ± 3 m	ma-xi-mum	mi-ni-mum	Mittel ± 3 m	ma-xi-mum	mi-ni-mum	Mittel ± 3 m	ma-xi-mum	mi-ni-mum
a) Vor der Degeneration									
3	57,0 \pm 0,4	97,1	29,9	56,6 \pm 0,4	97,1	29,9	71,0 \pm 2,2	82,4	52,2
b) Während der Degeneration									
19	40,1 \pm 0,9	84,5	21,6	39,0 \pm 1,0	84,5	21,6	44,8 \pm 1,0	68,3	23,7

Die zwei erstgenannten Tatsachen werden im Sinne der aufgedeckten Allozyklie des polytären X-Chromosoms und ihrer verschiedenen Stärke in seinen einzelnen Abschnitten ohne weiteres verständlich. Einer genauen Prüfung bedürfen die Kriterien, auf Grund welcher die drittgenannte Feststellung getroffen worden ist. Folgende Veränderungen in den Kernen des betreffenden Mitteldarmbereichs sind zu nennen, die den Degenerationsprozeß kennzeichnen und eine Trennung aufeinanderfolgender Zeitabschnitte ermöglichen: 1. Abnahme der mittleren Länge der X-Chromosomen (sowie auch der Autosomen — auf Messungen an letzteren ist verzichtet worden; Tabelle 4); 2. Verquellung und Verbreiterung aller Chromosomen in den schwach chromatischen, umgekehrt hingegen Verklumpung und Verschmälerung in den stark chromatischen Abschnitten (Abb. 14a, b); 3. allgemeine Vakuolisierung und Verblassen der chromatischen Strukturen (die in späten Stadien

der Degeneration ganz verschwinden); 4. Ansammlung von Melaninen im unmittelbaren Bereich der polytänen Kerne (Zeichen einer stark fortgeschrittenen Karyolyse).

Die Befunde erwecken den Anschein, als hätten die mit der Histolyse verbundenen stoffwechselphysiologischen Veränderungen eine „Aufhebung der Synapsis“ des polytänen X-Chromosoms zur Folge, sofern dieses genügend hohe Grade der Streckung und Bündelungs„dichte“ (s. S. 423) erreicht hat. Dafür spricht die in beiden Zeitabschnitten größere mittlere Länge der unvollständig oder nicht gepaarten X-Chromosomen gegenüber den vollständig gepaarten (Tabelle 4). Bevor jedoch nicht ein größeres Zahlenmaterial vorliegt und jüngere sowie solche Tiere untersucht worden sind, die bei extrem niedrigen Temperaturen aufgezogen wurden, sollen keine Schlüsse gezogen werden.

D. Diskussion

1. Morphologische Deutung der verschiedenen Erscheinungsformen des X-Chromosoms

Als beteiligt am Zustandekommen des äußerlichen Strukturbildes des X-Chromosoms werden fünf mögliche Faktoren in Betracht gezogen:

a) Eine submikroskopische Spirale oder Fältelung; b) die Art der Bündelung der Fibrillen im geschlossenen Verband (lamelläre, d. h. eindimensionale, oder massivzylindrische = zweidimensionale); c) die Bündelungsdichte (enge oder weite Abstände zwischen benachbarten Einzelfibrillen); d) Quanten einer sog. „peripheren“ Desoxyribonukleinsäure, die auf der Oberfläche der Fibrillen angereichert wird, und e) die Abhängigkeit der genannten Faktoren vom inneren und äußeren Milieu (Gewebespezifität, Polytaniegrad, Ernährung, Temperatur).

Auf die Möglichkeit, das beträchtliche Längenwachstum der polytänen Chromosomen mit der Streckung submikroskopischer Spiralen verständlich zu machen, hat BEERMANN (1952a, S. 187) hingewiesen. Auf der Basis seiner Vorstellung von den morphogenetischen Prozessen bei der Polytanisierung der Chromosomen in Dipteren läßt sich die mäanderartige Konfigurierung einzelner Abschnitte als Äußerung von Scherungskräften auffassen, die bei flächenhafter Ausbreitung schraubig um eine gemeinsame Achse gewundener Einzelfäden auftreten müssen (vgl. 1952a, Abb. 44). BEERMANN hat dabei die Frage der „Bündelungsdichte“ offengelassen. Gewebespezifische Unterschiede im „Schlankheitsgrad“ der Chromosomen deutete er auf Grund festgestellter Längen-Durchmesserverhältnisse (vgl. 1952a, Tabelle 2, S. 163) als konstante Unterschiede in der Ganghöhe der Schraubenwindungen der Einzelfibrillen.

Mit einer Einschränkung (s. weiter unten) läßt sich die Morphogenese des X-Chromosoms von *Phryne* in diesem Sinne deuten. Die Analyse

des Streckungsprozesses hat gezeigt, daß die Pseudochromomeren, d. h. die mäandrisch oder spiralig verlaufenden Strukturen des gestauchten X-Chromosoms nichts anderes darstellen, als die von BEERMANN (1952a, S. 155) an den Autosomen von *Chironomus* beschriebene Mäanderstruktur. Die Angabe des genannten Autors, daß die Mäanderstruktur für ein bestimmtes Entwicklungsstadium im Längenwachstum der Riesenchromosomen charakteristisch ist, wird bestätigt. Die Besonderheit des polytänen X-Chromosoms von *Phryne* besteht einfach darin, daß seine

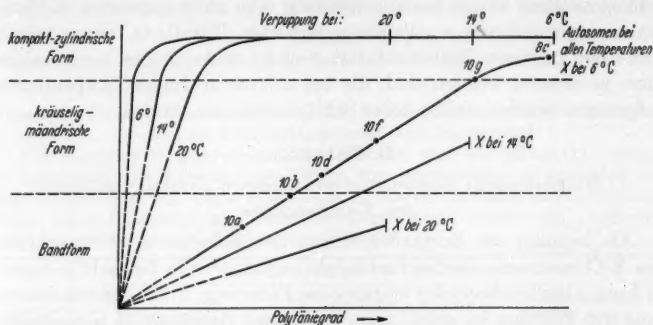


Abb. 15. Schematische Darstellung des Formwechsels des X-Chromosoms in den Speicheldrüsen als Funktion des Polytäniegrades bzw. der Aufzuchttemperatur der Larven (vgl. S. 426–427). Das Diagramm (nach einem Entwurf von Dr. W. BEERMANN) soll den Gang der strukturellen Entwicklung von Autosomen und X-Chromosomen (bis zum Zeitpunkt der Verpuppung) bei verschiedenen Aufzuchttemperaturen veranschaulichen. Die Angaben längs der 6°-Linie des X-Chromosoms beziehen sich auf einige Abbildungen, in denen letzteres in den betreffenden Entwicklungsstadien dargestellt ist

Entwicklung normalerweise nicht über das „Mäanderstadium“ hinausführt, während die Autosomen das zylindrische Endstadium erreichen. Darauf beruht der im Vergleich zur Mitose zu hohe Längenunterschied zwischen Autosomen und X in den polytänen Somazellen von Larven, die bei normalen Temperaturen aufgewachsen sind (Abb. 15).

Nach BEERMANN sind die Fibrillen auch in bandförmigen Riesenchromosomen schraubig angeordnet, indem das Band wie auf der Oberfläche eines Zylinders und um dessen Achse gewunden verläuft. Das Chromosom wird kompakt, indem neue Fibrillenzüge angelegt werden, die den axialen Hohlraum im Zuge der fortschreitenden Polytänisierung ausfüllen. Seine Streckung wird auf eine Ganghöhen-Steigerung aller Fibrillenschrauben im Zuge der Vermehrung und Massierung der Längselemente zurückgeführt. Die Ursache anhaltender „Stauchung“ wird in Asynchronien bei der Massierung gesucht: Sie bedingen eine noch geringe Steigung der Schraubenzüge innerhalb der lamellär gebliebenen Regionen des Fibrillenbündels gegenüber der größer gewordenen Stei-

gung im Bereich der massierten Randpartien. Unter „Stauchung“ wird also ein Streckungszustand verstanden, der durch die Minimalwerte der Ganghöhe innerhalb der einzelnen Abschnitte des Bündels bestimmt wird.

Man kann das extrem gestauchte, lamelläre X-Chromosom als kurzen Abschnitt eines Schraubenbandes im Sinne BEERMANNs auffassen und annehmen, daß die Spuren der Tordierung bei der Präparation (Quetschen) verlorengegangen sind. Nach dieser Vorstellung — schraubiger Verlauf aller Fibrillen um eine gemeinsame Achse — läßt sich das Ausmaß der Streckung aus einer Ganghöhenzunahme allein nur bei denjenigen Typen des gestauchten X erklären, die einem zylindrisch gebauten Wendel mit vielen Umgängen vergleichbar sind. Solche schraubig-lamelläre Formen sind in frühen Stadien der Streckung tatsächlich beobachtet worden (Abb. 7 e, f, 10 c). Als weitaus häufiger erwiesen sich jedoch einebig-lamellär gebaute Typen, an denen niemals Spuren einer — eventuell vor dem Quetschen der Kerne vorhandenen — Tordierung erkannt werden konnten (Abb. 5 a, 7 a, 10 a). Längere bandförmige Abschnitte¹ sind auch bei stark gestreckten X-Chromosomen gelegentlich beobachtet worden; sie sind dann flach ausgebreitet und nicht tordiert.

Es erscheint hiernach fraglich, ob die von BEERMANN geforderte submikroskopische Schraubenstruktur mit einer Windung der Fibrillen um eine gemeinsame Achse verbunden sein muß. Das Vorkommen von Riesenchromosomen, die vor — und im Bereich größerer Abschnitte noch während — ihrer Streckung einebig-lamellär gebaut sind, läßt eher an eine Verkürzung der Fibrillen längs individueller Achsen denken. Bei dieser Betrachtungsweise ist es — von der Frage nach dem Mechanismus der Reduplikation abgesehen — gleichgültig, ob man sich die gestauchten Fibrillen als gefaltete oder in sich (nicht umeinander) schraubig gewundene Molekülketten vorstellt und ihre Streckung — dementsprechend — als Folge einer molekularen Entfältelung oder als Folge einer Ganghöhenzunahme in einer molekularen Spirale.

Von vornherein zylindrische Typen des X-Chromosoms (s. z. B. Abb. 10 c) gehen vielleicht auf eine Relationsspirale zurück. Faßt man die Polytänsierung als einen Assimilationsvorgang auf, bei dem sich nur ganze, zusammenhängende Fibrillen „anlegen“, dann müßten zylindrische bzw. lamelläre Typen des frühlarvalen X in den Speicheldrüsen resultieren, je nachdem die Primärfibrillen umeinander gewunden waren oder nicht. Die Bedingungen, die über das Vorhandensein oder Fehlen einer Relationsspirale entscheiden, dürften innerhalb der embryonalen Anlagen für die Speicheldrüsen sehr gleichartig sein. Eine

¹ Bei *Mycetobia pallipes* können völlig gestreckte, extrem flache Bänder ohne schraubige Verwindungen innerhalb langer Abschnitte auftreten (WOLF, unveröffentlicht).

dann zu erwartende Ähnlichkeit der Bautypen des ungestreckten X-Chromosoms innerhalb des gleichen Individuums ist in der Tat beobachtet worden (s. S. 407).

Die morphologischen Verhältnisse während der Streckung des X-Chromosoms werden somit weitgehend im Sinne BEERMANNs unter den Annahmen a) einer submikroskopischen Spirale oder Fältelung der Fibrillen (allerdings längs individueller Achsen), b) einer Korrelation zwischen

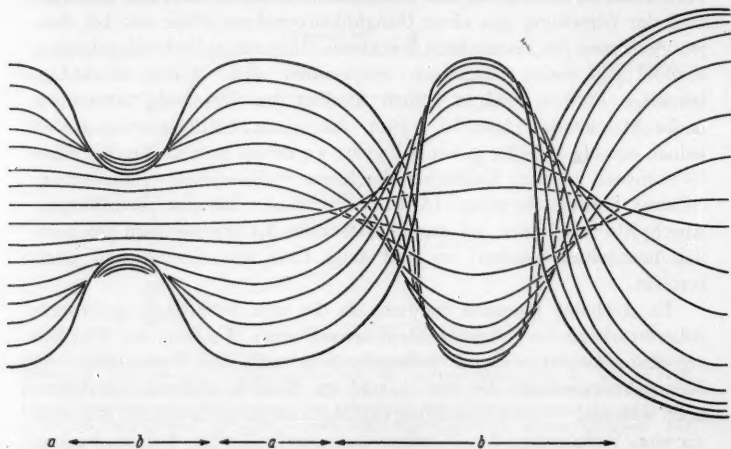


Abb. 16. Hypothetische Vorstellung vom Fibrillenverlauf während der Kräuselungsphase des Streckungsvorgangs unter Annahme einer veränderlichen Bündelungsdichte (vgl. S. 423—425). a lamellär-bandförmiger, b kräuselig-mäandrischer Bau. Die randlich gelegenen Fibrillen werden (unter Beseitigung einer im Schema nicht symbolisierten molekularen Fältelung) zweidimensional gebündelt und dabei länger. Mäanderbildung durch Kräuselung von Randabschnitten. Aus zeichentechnischen Gründen ist die Massierung der Fibrillen flächenhaft (durch Verringerung der Fibrillenabstände) dargestellt

Massierung und Streckung und c) von Asynchronien zwischen den Längselementen auf gleicher Höhe während dieser Vorgänge gedeutet: Von den Fibrillen, die primär in einer Ebene parallel verlaufen, massieren und strecken sich simultan zuerst die randlich gelegenen; die hierbei sich bildenden Randwülste müssen, solange der Zug von noch ungestreckten Elementen in anderen Querabschnitten des Fibrillenbandes anhält, gekräuselt, zum Teil extrem mäandrisch, verlaufen; dabei erscheint das Chromosom ziehharmonikaartig, abschnittsweise manchmal auch schraubig, zusammengeschoben (Abb. 7c—f, 16). Erst nachdem sämtliche Fibrillen — unter Einbeziehung in den immer stärker werdenden Randwulst — die gleiche größere Länge erreicht haben und ein vorübergehend spiralig oder, besser ausgedrückt, geschlängelt verlaufendes massives

Bündel entstanden ist (wie abschnittsweise in Abb. 8a, 10f), tritt die endgültige Streckung des Chromosoms ein (Abb. 17).

Folgende Beobachtungen an *Phryne* sprechen dafür, daß im Streckungsvorgang auch eine laterale Bewegung der Fibrillen eingeschaltet ist, d. h., daß deren Bündelungs„dichte“ variiert: 1. Die Massierung der Fibrillen, d. h. der Übergang von einer „lamellären“ zur massiven Bündelung, erfolgt in relativ späten Stadien. Sie ist also weniger das Ergebnis einer Vermehrung als einer Umordnung der Längselemente

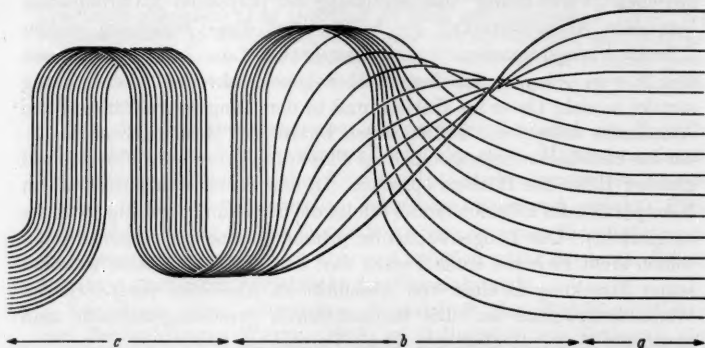


Abb. 17. Hypothetische Vorstellung des Verlaufs der Fibrillen während der Glättungsphase (vgl. S. 425). Allmähliche Einbeziehung aller Fibrillen in den massiv-zylindrisch gewordenen Teil (c) des Bündels. Es wird angenommen, daß dabei die kräuselige Verwindung der Fibrillen, wie sie im Schema (stark auseinandergezogen) angedeutet ist, durch eine gegenläufige Bewegung kompensiert wird (im übrigen wie Abb. 16)

im Verband. 2. Das zylindrische X kann, wie die Autosomen, bei gleicher Breite eine verschiedene Länge haben (s. S. 414 und Tabelle 3). 3. Im Verlauf der Riesenchromosomen treten teils fakultativ, teils konstant, fadenartige Einengungen auf, die eine extrem enge „Packung“ der Fibrillen anzeigen. Es kann also auf eine zeitliche bzw. räumliche Variabilität der „Dichte“ der Bündelung von Chromosomenuntereinheiten geschlossen werden.

Eine Variabilität der Bündelungsdichte im Bereich einzelner Loci haben bereits BEERMANN (1952b) und MECHTELKE (1953) nachgewiesen. Da sie sich als gewebe- bzw. funktionsspezifisch erwies, wurde sie von ihnen mit einer differentiellen Abstimmung von Genaktivitäten in Zusammenhang gebracht. Die „Verdichtung“ bandförmiger, polytärer Chromosomen im Zuge ihres Längenwachstums, das mit einer Massierung ihrer Elemente einsetzt, kann zunächst als Folge einer Verringerung der Summe aller Fibrillenabstände im Bündel unter Konstantbleiben der Einzelabstände angesehen werden. Darüber hinaus kann noch eine

verschieden enge „Packung“ der Fibrillen, also ein Größer- bzw. Kleinerwerden der Abstände zwischen benachbarten Elementen, angenommen werden. Drittens läßt sich der Prozeß der „Verdichtung“ auch auf das Fusionsbestreben einer färbbaren (DNS-haltigen) Füllsubstanz, mit der die Fibrillen an ihren chromatischen Abschnitten „beladen“ werden, zurückführen.

Ohne zunächst abzuwägen, welche von den 3 Versionen des Begriffs „Verdichtung“ vorzuziehen ist, wird dem offensichtlichen Zusammenhang zwischen „Verdichtung“ und Streckung des polytänen X-Chromosoms besondere Aufmerksamkeit geschenkt¹. Auf diese Beziehung weisen 2 Beobachtungstatsachen: 1. Der Gesamtablauf des Längenwachstums des X von *Phryne*: Im Zuge seiner „nachhinkenden“ Verdichtung streckt es sich, bis es im Habitus und in den Längenverhältnissen den Autosomen entspricht. 2. Diejenigen Details der Morphogenese des X, die für bestehende Asynchronien im Streckungsprozeß der Fibrillen auf gleicher Höhe des Bündels sprechen: In den zuerst sich massierenden Randpartien des Fibrillenbandes erfolgt die Streckung vorzeitig (Kräuselungseffekt). Das Längenwachstum primär gestauchter Riesenchromosomen stellt hiernach einen Prozeß dar, dem das Chromosom während seiner Streckung in einer von Abschnitt zu Abschnitt veränderlichen Weise unterworfen ist. Die beobachtbaren Streckungszustände sind gleichsam Momentaufnahmen dieses Vorganges.

Im Sinne des geschilderten Wechsels in der Bündelungsart und -dicke der Fibrillen lassen sich 3 Bautypen des polytänen X-Chromosoms (bzw. seiner einzelnen Abschnitte) unterscheiden. 1. Lamellärbandförmiger Bau: Annähernd in einer Ebene und dabei parallel verlaufende (d. h. eindimensional „gebündelte“ = einschichtig angeordnete) Fibrillen (*a* in Abb. 16 und 17; vgl. Abb. 3b, 5a, 7a, 10a, b, distaler Abschnitt des X in 10e). 2. Kräuselig-mäandrischer Bau: Einige — vorzugsweise die randlich gelegenen — Fibrillen sind zweidimensional gebündelt (d. h. massiert) und gleichzeitig gestreckt, wobei sie — infolge des Zuges der noch gekürzten Elemente — gekräuselt oder mäandrisch, streckenweise eventuell auch spiralig, verlaufen (*b* in Abb. 16 und 17; vgl. Abb. 6b, 7c—f, 8b, 10c, d). 3. Massiv-zylindrischer Bau: Sämtliche Fibrillen haben die gleiche Länge gewonnen und verlaufen wieder nahezu parallel (*c* in Abb. 17; vgl. Abb. 8c, 13b, f). Der erstgenannte Bautyp tritt nur abschnittsweise oder gar nicht in Erscheinung, wenn eine Relationsspirale der Primärfibrillen vorhanden war. In diesem Falle ist das X-Chromosom von vornherein teilweise oder in ganzer Länge zylindrisch gebaut (Abb. 10e, c, 7e, f).

¹ Auf die Frage, warum sich das Mitosechromosom, umgekehrt wie das polytäne, verkürzt, wenn es sich kontrahiert, wird in einer späteren Arbeit eingegangen.

Der Streckungsprozeß läßt sich in 2 Phasen einteilen, eine Kräuselungs- und eine Glättungsphase. Die erste führt vom lamellär-bandförmigen zum kräuselig-mäandrischen, letztgenannte unter gleichmäßiger Streckung sämtlicher Elemente des Fibrillenbündels zum massiv-zylindrischen Bau. Damit verbunden sind vermutlich kurze, halbkreisförmige — in ihrer Richtung alternierende — Rotationsbewegungen der einzelnen Randabschnitte in der Kräuselungsphase, entgegengesetzt gerichtete, d. h. ausgleichende Bewegungen in der Glättungsphase.

Bei dem massiv-zylindrischen Bautyp wird (von submikroskopischen Richtungsänderungen abgesehen) nicht unbedingt an einen geradegestreckten Verlauf der Fibrillen gedacht. Es wird die Möglichkeit eines nach der Streckung manchmal verbleibenden Spiralverlaufes der Fibrillen, die als Ursache für das auffällige „criss-cross pattern“ in leicht gedehnten Riesenchromosomen angesehen worden ist, offen gelassen.

Von den drei oben genannten Auffassungen bezüglich des Begriffs „Verdichtung des Fibrillenbündels“ wird die erste (Massierung durch Verringerung der Summe aller Fibrillenabstände bei konstanten Einzelabständen) den morphologischen Tatsachen weitgehend gerecht. Eine plausible Erklärung für das Zustandekommen extremer Einschnürungen an Riesenchromosomen wird aber erst möglich unter der zusätzlichen Annahme auch einer Variabilität der Einzelabstände.

Zur Frage einer allgemeinen Variabilität der Bündelungsdichte sind Beobachtungen WHITES (1948) an Gallmücken von Interesse. In deren Speicheldrüsen entdeckte er verschieden große Kerne; die kleinen und mittelgroßen Kerne enthielten im allgemeinen polytane, die großen (von ihm als „polyploid“ bezeichneten) Kerne dagegen diffuse Chromosomen. Sog. „Übergangs“kerne fand er teils polytän, teils „polyploid“ strukturiert, d. h. in einem Kernbereich erschienen die Chromosomen gebündelt, in dem anderen diffus. BARIGOZZI und SEMENZA (1952) fanden die Chromosomen in den Speicheldrüsen von *Aphiochaeta xanthina* nur bei Ernährung der Larven mit einem an Aminosäuren und Fetten reichen Futter polytän, andernfalls diffus. Möglicherweise spielen also andere Faktoren (vielleicht Menge und örtliche Verschiedenheiten in der chemischen Zusammensetzung des Kernsaftes) eine entscheidendere Rolle in der Strukturbestimmung der Riesenchromosomen als der Polytaniegrad. Auf Unabhängigkeit von letzterem weist auch die Kontraktionsverzögerung des nicht polytänen X-Chromosoms von *Phryne* in der Prophase.

Rein morphologisch ließe sich das Streckungswachstum der Riesenchromosomen noch plausibler unter der Annahme extrem variabler Quanten „freier“ DNS auf der Oberfläche der Fibrillen erklären. Der größte Teil, wenn nicht alles feulgenpositiv reagierende Material, das am Aufbau der Chromosomen beteiligt ist — Nukleoprotein vom Desoxyribosetyp — wäre dabei als undifferenziertes Supplement aufzufassen,

das auf einer differenzierten Protein- (oder Nukleoprotein-) Faser in bestimmten, durch das genetische Muster gegebenen Bereichen angereichert wird und dabei eine molekulare Fältelung der Faser beseitigt. Als gefältelt angesehen würden dann nur noch die Fibrillenabschnitte in den achromatischen Bezirken (im Gegensatz zu RIS und CROUSE 1945). Die Massierung der Fibrillen im Zuge ihrer Chromatisierung und Streckung ließe sich als Folge eines allgemeinen (unspezifischen) Fusionsbestrebens der DNS, wie es am Kompaktheterochromatin sehr häufig hervortritt, ansehen.

Obwohl schwerwiegende Befunde anderer Autoren es nicht ratsam erscheinen lassen, diese „Supplement“-Hypothese näher in Betracht zu ziehen, existieren auch Sachverhalte, die für sie sprechen. Aus Ergebnissen von Schwellungs- und Infrarot-Untersuchungen schließen AMBROSE und BUTLER (1953, vgl. auch AMBROSE 1956, S. 32), daß Proteine, die intramolekular gefaltet (d. h. in der α -Form; vgl. ASTBURY und DICKINSON 1935) stabil sind, bei Kontakt mit Nukleinsäure β -Form annehmen, d. h. gestreckt werden. Auf die Möglichkeit einer Variabilität der relativen DNS-Quanten der einzelnen „Bande“ (vgl. S. 428) deuten a) die sehr schwankenden Messungswerte von UV-Absorptionsspektren (COLE und SUTTON 1941), b) die spezifischen Ausprägungsunterschiede in heterochromatischen Abschnitten im Laufe des Wachstums (PAVAN 1946), c) die Beziehung zwischen der Menge von Heterochromatin und der Färbbarkeit und Strukturierung der Chromosomen — besonders ihrer Enden — im polytären Kern (SCHULTZ 1947). Die von SENGÜN (1954b) angegebene Variabilität des Bandenmusters der Riesenchromosomen von *Drosophila repleta* ließe sich auf der Basis der „Supplement“-hypothese, ohne die abwegige Postulierung einer strukturellen Diskontinuität, leicht erklären.

2. Die Allozyklie des X-Chromosoms und der Kinetochorenabschnitte der Autosomen

Vorgänge an den Autosomen in frühen und mittleren Stadien ihrer Polytänisierung, auf deren Beschreibung hier verzichtet wird, machen wahrscheinlich, daß in ihrer Entwicklung ähnliche Straffungs- und Streckungsprozesse, wie sie als morphologische Reihe am X-Chromosom beobachtet wurden, eingeschlossen sind. Lamellär-bandförmige Strukturierung ist an ihnen allerdings nur an einzelnen Abschnitten zu beobachten. Allgemein geht ihrem massiv-zyklindrischen Bau ein kräuselig-mäandrischer voran, der sich bei hohen Aufzuchttemperaturen abschnittsweise bis zum Zeitpunkt der Verpuppung erhalten kann (z. B. in Abb. 3a, b, 5a). Der Unterschied zwischen Autosomen und X besteht hauptsächlich darin, daß die Streckung beim letztgenannten, je nach Außenbedin-

gungen, gar nicht oder sehr viel später als bei den Autosomen einsetzt (Abb. 15). Diese Sonderheit des X-Chromosoms bei der Polyänisierung der somatischen Kerne kann als bisher unbekannte Teilerscheinung seines allgemeinen allozyklischen Verhaltens, wie es in Mitose und Meiose zutage tritt, gewertet werden. Ihre Ursache wird, wie das schon HEITZ (1928, S. 815) bei der Beschreibung der Heteropyknose von Chromosomen der Moose tat und wie es auch WHITE (1948) bei der Beurteilung abweichend gebauter Riesenchromosomen zum Ausdruck brachte, in einer Spezifität der genetischen Struktur gesucht.

Bisher sind Fälle eines allozyklischen Verhaltens von Chromosomen nur aus Kernteilungen berichtet worden. So haben KOLLER und DARLINGTON (1934, KOLLER 1938) die Geschlechtschromosomen bei der Ratte bzw. Abschnitte von ihnen beim Goldhamster als „unterverdichtet“ in der Meiose beschrieben. In Übereinstimmung mit dem vorliegenden Beispiel wurde bei vielen Heuschrecken Unterverdichtung bzw. negative Heteropyknose (oder Heterochromatie) für das X in den Spermato gonien angegeben (WHITE 1935, 1948, WHITE und NICKERSON 1951, DARLINGTON und LA COUR 1936, KLINGSTEDT 1941 usw.). Vielleicht stellen die von SLIZYNSKI (1955) angegebenen „puffy regions“ an den pachytänen X- und Y-Chromosomen der Hausmaus stark allozyklische Abschnitte dar. Daß neben endogenen Faktoren, in denen zunächst die Ursache für einen abweichenden Verdichtungszyklus gesucht wurde, auch exogene beteiligt sein können, haben bereits Beobachtungen von DARLINGTON und LA COUR (1935), GEITLER (1940) und MECHELKE (1955) an Pflanzen gezeigt. Die genannten Autoren stellten eine relativ schwächere Färbung bestimmter Abschnitte an den Mitosechromosomen als temperaturbedingte Erscheinung fest. Damit war allozyklisches Verhalten als *Reaktionsverschiedenheit* (GEITLER 1940) angezeigt, die sich im Gefolge von Störungen oder Schwankungen im normalen Stoffwechselzyklus der Zellen am Chromosom auswirken kann.

Die an *Phryne* gewonnenen Ergebnisse stimmen mit GEITLERS Auffassung überein, wobei die Beobachtungstatsache herauszustellen ist, daß sich die allozyklisch bedingten Unterschiede zwischen X-Chromosom und Autosomen bei tiefen Aufzuchttemperaturen am Ende der Larvalperiode verlieren. Es besteht kaum ein Zweifel, daß die schwache Färbbarkeit des X gegenüber den Autosomen in 20°-Zuchten (s. z. B. Abb. 6a) auf einen relativen Mangel an DNS, der in „Kälte“-Zuchten aufgehoben wird, zurückgeht. Es bleibt abzuwarten, ob sich dieser Verdacht durch den mikrospektrophotometrischen Nachweis einer Zunahme des DNS/Protein-Verhältnisses beim X mit dessen Streckungsgrad (und mit dem mittleren Kerndurchmesser) bestätigen läßt. Genügend Grund zu der Ansicht, daß DNS nicht als ausschließlicher Bestandteil zumindest der kontinuierlichen Grundstruktur der Chromo-

somen angesehen werden muß, liefern a) die Ergebnisse chemisch-zytologischer Untersuchungen an isolierten Chromosomen aus Lymphozyten (MIRSKY und RIS 1947), desgleichen an Speicheldrüsen von *Drosophila* (MAZIA und JAEGER 1939), b) die Feststellung von Schwankungen des DNS-Gehaltes in Zellen verschiedener Gewebe bei *Tradescantia* (SCHRADER und LEUCHTENBERGER 1949) und in Zellen eines Drüsengewebes — korreliert mit einem Sekretions-Rhythmus — bei Schnecken (LEUCHTENBERGER und SCHRADER 1952), c) der direkte Nachweis „freier“ extrachromosomaler Nukleinsäure in der Zelle (BAYREUTHER 1952, 1955, STICH 1954).

In Anlehnung an die „Träger“-Hypothese FREY-WYSSLINGS (1944, 1948, S. 149—155) und die von DARLINGTON und LA COUR (1940) entwickelte Vorstellung sowie im Hinblick auf die schon genannten Befunde von COLE und SUTTON (1941) wird allozyklisches Verhalten vorläufig als Folge einer Unter„sättigung“ allo- gegenüber „eu“zyklischer¹ Abschnitte an oberflächlich gebundenen Nukleoproteinen angesehen. Die Ursache von Unterschieden im „Verdichtungs“grad (sowohl polytärer wie mitotischer Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte) besteht nach dieser Arbeitshypothese in einer unterschiedlichen Fähigkeit, „freie“ DNS oberflächlich zu binden. Eine gegenüber euchromatischen Abschnitten später eintretende „Absättigung“ des polytären Chromosoms in allen seinen allozyklischen Regionen mit „peripherer“ DNS wäre danach die Vorbedingung für „normale“ Verdichtung, Ausbildung des Querscheibnmusters und Streckung auf eine den mitotischen Verhältnissen entsprechende Länge.

Eine andere Deutung wäre dem Versuch DARLINGTONs (1955, S. 1147) gleichzusetzen, „DNS-starvation“ von Mitosechromosomen oder Abschnitten derselben mit einer lokalen Herabsetzung des „Polynemie“-grades (Anzahl angenommener Untereinheiten des Chromosoms) zu erklären. Die vorliegenden Befunde sprechen im großen und ganzen nicht dafür, daß das abweichende Verhalten des polytären X auf einem relativ niedrigeren Polytäniegrad — gewissermaßen in einer Hemmung der Reduplikation (vgl. auch SCHULTZ 1947, S. 180) am X gegenüber den Autosomen — beruht. Auch das gelegentlich sehr schwache Hervortreten des X bei Aufzucht in Wärme (Abb. 6a) stellt kein Indiz für diese Deutung dar. Wo das X erkennbar wird, hat es eine Breite, die Unterschiede gegenüber den Autosomen nur in der Bündelung, nicht aber in der Anzahl der Fibrillen vermuten läßt.

Bevor nicht Ergebnisse mikrospektrophotometrischer Messungen vorliegen, kann über die Eignung der einen oder anderen Hypothese nicht entschieden werden. Fest steht zunächst, daß Struktur und Verhalten

¹ Dieser Terminus wird als Gegensatz zu „allozyklisch“ vorgeschlagen.

allozyklischer Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte in erster Linie von genetischen Faktoren kontrolliert werden (sie bedingen einen von Abschnitt zu Abschnitt verschiedenen Allozykliegrad), ferner von inneren¹ und äußeren Milieufaktoren, wobei diesen im Grunde nur eine modifizierende Wirkung beizumessen ist (Gewebespezifität, Polytäniegrad, Ernährungs- und Temperaturbedingungen).

Von Interesse für das Problem der Kinetik allozyklischer Chromosomen ist die Beantwortung der Frage, ob zwischen Verdichtungsgrad und Paarungsaffinität homologer Chromosomen bzw. homologer Abschnitte eine Beziehung besteht. Zwei Beobachtungen an *Phryne* stellen erste Hinweise hierfür dar: Das relativ frühere Abklingen der somatischen Paarung der X-Chromosomen nach ihrer Verdichtung in der Mitose (vgl. S. 404 und Abb. 2d, e) und die häufige Nichtpaarung des polytänen X-Chromosoms in jenen somatischen Zellen, in denen es einen maximalen Verdichtungs- und Streckungsgrad erreicht (großkernige Mitteldarmzellen, vgl. S. 417—419, Abb. 14b, c). Es wäre denkbar, a) daß engere Bündelung (bzw. stärkere „DNS-Beladung“) der Fibrillen mit einer Neutralisierung derselben Kräfte, die die somatische Paarung bewirken, verbunden ist, b) daß der zu dieser Neutralisierung nötige „Verdichtungs“grad (bzw. die nötige Menge „peripherer“ DNS) innerhalb allozyklischer Abschnitte relativ niedriger ist als in euzyklischen.

Damit ist das Prinzip einer Arbeitshypothese angedeutet, zu der DARLINGTON und LA COUR (1940) mit der schon erwähnten Vorstellung, daß Chromosomen (oder Chromosomenabschnitte) mit DNS „unter“ oder „überbeladen“ sein können, angeregt haben. Sie könnte ein erster Ansatz zu einem Versuch sein, einen einheitlichen Gesichtspunkt zu finden, von dem aus gesehen die vielfältigen und charakteristischen Verhaltensweisen von Heterochromosomen und allozyklischen Chromosomenabschnitten erklärlich werden. Im Sinne der vorgeschlagenen Deutung der Befunde an *Phryne* wäre Überbeladung der Chromosomen mit DNS Folge einer selektiven Intensivierung der DNS-Synthese bei tiefen Temperaturen, die zu einer stärkeren Verdichtung der Chromosomen und einer damit verbundenen Asynapsis zuerst in den allozyklischen Abschnitten — führt. Für einen solchen Sachverhalt spricht die Beobachtung eines vorzeitigen Spontanzerfalls der Heterochromosomen von *Phryne* in den „Riesen“-Spermatozyten I (die häufig in ♂-Larven aus Kältezuchten auftreten). In ihnen zerfallen sowohl die übernormal großen Bivalente als auch die Heterochromosomen noch vor Erreichen des maximalen (metaphasischen) Verdichtungszustandes

¹ Nach Befunden von SCHULTZ (1947, S. 187) ist z. B. eine Auswirkung der Heterochromatinquanten auf die Bündelungsdichte im polytänen Kern denkbar.

längs des Äquationsspaltes in je 2 Hälften; hierbei spalten sich die Heterochromosomen eher als die Autosomen (WOLF 1954, S. 290—291).

Sinnentsprechend ließe sich so die beginnende Diplotänabstoßung der Autosomen im Zuge ihrer zunehmenden Verdichtung während der Kontraktionsphase in der Spermatogenese von Nematoceren deuten (vgl. WOLF 1941, Abb. 2, 8, 11 und 21, ferner 1950, Abb. 4 und 5). Bei achiasmatischer Meiose bleibt diese Abstoßung auf die Kinetochorenabschnitte beschränkt. Den vorliegenden Befunden zufolge besitzen die Autosomen von *Phryne* in der Region der Kinetochore tatsächlich einen verbreiterten, stark aufgelockerten, offenbar allozyklischen Abschnitt (vgl. S. 399; K in Abb. 3a, b, 6a). Ein Homologon liegt zweifellos in den von ROTHFELS und DUNBAR (1953) bei *Simulium vittatum* beobachteten „expanded regions“ in den Centromerenbereichen der Speicheldrüsenchromosomen vor.

Von großem Interesse würde die Beantwortung der Frage sein, ob die nicht zufällige Verteilung der Paarungslücken entlang der Riesenchromosomen von *Simulium* sp. und *Bibio marci*, die KUNZE (1953, S. 509) auf „ein unsichtbares Muster chemischer Art“ in den Chromosomen zurückführt, auf leichten Allozyklen beruht. Es soll damit ausgesprochen sein, daß von Abschnitt zu Abschnitt, wie von Chromosom zu Chromosom, genetisch bedingte Verdichtungsunterschiede denkbar sind, die eine regionsspezifische Stärke der Paarungsaффinität zur Folge haben.

In diesem Sinne ließe sich auch der HEITZsche Heterochromatimbegriff einheitlich auslegen: Abweichungen von dem (vorläufig nicht näher zu definierenden) durchschnittlichen Verdichtungszustand der Chromosomen könnten als positiv- bzw. negativ-allozyklisch (abgekürzt: + bzw. —alloz.) formuliert werden, je nachdem ihre Extreme in Zuständen bestehen, die unter den Bezeichnungen α - bzw. β - (HEITZ 1934) oder kompakt- bzw. diffusheterochromatisch (WHITE 1948) usw. verstanden werden. Die größere Breite der Riesenchromosomen in den negativ-allozyklischen Abschnitten wäre einfach als Folge einer weniger starken Anziehung der Fibrillen anzusehen. Die relativ geringere Breite kompakt-heterochromatischer Abschnitte und deren häufige Einengung zu einem dünnen Faden wären dagegen Anzeichen für eine starke Anziehung der Fibrillen. Die heterochromatischen „Blöcke“ kann man als Knäuel auffassen, in denen längere Abschnitte der Fibrillen — maximal gestreckt und extrem eng gebündelt — einbezogen sind. Die Tendenz des Chromatins, zu fusionieren, könnte hier eine Rolle spielen.

Fadenförmige Verengungen der Riesenchromosomen hat BEERMANN (mündliche Mitteilung) auch bei *Sciara* beobachtet. Bei *Phryne cincta* kann die Eigentümlichkeit zum Zerfall eines Riesenchromosoms in zwei scheinbar ganz selbständige,

zufällig gelegene Bruchstücke führen, wenn ein größerer interkalärer Heterochromatinblock in ihm vorhanden ist. Ein solcher Fall liegt beim X-Chromosom einer Allgäuer Population vor. In der Mitose ist dieses doppelt so lang wie das hier beschriebene X-Chromosom (WOLF 1954, S. 284), in den Speicheldrüsenkernen dagegen etwa ebenso lang. Vor allem zeichnet es sich durch den Besitz eines ungewöhnlich großen, interkalären kompakt-heterochromatischen Abschnitts in seiner distalen Hälfte aus. In seinem Bereich kann das Chromosom zu einem langen Faden, der meist gar nicht in ganzer Ausdehnung verfolgbar ist, verengt sein. Die Erscheinung ist in zahlreichen, zuweilen über 50% der Speicheldrüsenzellen eines jeden Individuums zu beobachten.

3. Vergleichbare morphologische Befunde an den Riesenchromosomen anderer Dipteren

Strukturverhältnisse, wie sie beim gestauchten X-Chromosom von *Phryne* vorliegen und die Querscheibenhomologisierung erschweren, kommen auch bei den Riesenchromosomen anderer Dipteren vor. BEERMANN (1952, S. 192) hat auf mehrere Chironomiden hingewiesen, bei denen ein einzelnes Chromosom in seiner äußerlichen Architektur von den übrigen abweicht. WHITE (1948) gibt den gleichen Sachverhalt für eine Gallmückenart der Gattung *Camptomyia* an. Bei *Taxomyia taxi* (WHITE 1947) und *Hartigiola annulipes* (WOLF, unveröffentlicht) sind es alle 4 Chromosomenpaare (in beiden Fällen $2n=8$), die in den Speicheldrüsenkernen einen Habitus aufweisen, der mit dem des X von *Phryne* vor seiner Streckung vergleichbar ist. Darüber hinaus wurde — ganz entsprechend den Befunden WHITEs an anderen Gallmücken (vgl. S. 425) — bei *Hartigiola* eine interzelluläre Variation beobachtet: Die Chromosomen erschienen in manchen Kernen granulär, in anderen Kernen (derselben Speicheldrüse) ähnlich strukturiert wie das gestauchte X von *Phryne*; vereinzelt waren auch schon weitgehend gestreckte Elemente mit kompakten, aber noch mäandrisch gewundenen Abschnitten aufzufinden, in denen das Querscheibenmuster sichtbar wurde. Zweifellos geht die beobachtete Variation auf Asynchronien im Verdichtungsprozeß zurück, der sich an den Chromosomen während ihrer Polytänisierung abspielt.

Bei anderen Dipteren scheint das Ausmaß interzellulärer struktureller Variation sogar von normalen, sichtbar-fibrillären Zuständen der Riesenchromosomen über granuläre hinwegzureichen bis zu einer scheinbar völligen Auflösung derselben zu homogenen Massen. BORYSKO (1952), der in Speicheldrüsenkernen mit Chromosomen im letztgenannten Zustand bei *Musca domestica* und *Phormia regina* auch elektronenmikroskopisch keine Fibrillenstruktur nachzuweisen vermochte, bestritt einfach deren Vorhandensein. Die vorliegenden und WHITEs (1948) Befunde, ebenso der von BEERMANN und BAHR (1954) erbrachte elektronenoptische Nachweis eines kontinuierlichen Fibrillenverlaufs auch an Stellen extremer Aufspaltung des Chromonemenbündels (Randpartien

des Balbiani-Ringes im Chromosom 4 von *Chironomus*), sprechen gegen eine derartige Schlußfolgerung. Es liegt eher die Vermutung nahe, daß physiologisch bedingte Unterschiede im Verdichtungszustand der Chromosomen die Ursache der Variation darstellen. Keine der verschiedenartigen Zustandsformen, in denen die Chromosomen polytärer Dipterenkerne auftreten können, dürften mit dem Verlust des fibrillären Aufbaues der Chromosomen verbunden sein. Wahrscheinlich befinden sich vom Normaltyp abweichend strukturierte Chromosomen in einem bestimmten Stadium des — hier am X von *Phryne* beschriebenen — Bündelungs- und Streckungsprozesses, über das hinaus die Entwicklung nicht weitergegangen ist.

Eine maßgebliche Rolle könnten ernährungs- oder entwicklungsphysiologische Veränderungen oder Schwankungen in den Somazellen spielen. Daß zwischen ihnen und der Dichte der Fibrillenbündelung Korrelationen bestehen, geht aus den Befunden von BARIGOZZI und SEMENZA (vgl. S. 425) hervor und haben BEERMANNs (1952b) und MEHELKES (1953) Feststellung von zellspezifischen bzw. sogar reversiblen Strukturmodifikationen gezeigt. Es ist nicht ausgeschlossen, daß es Fälle gibt, in denen ein erreichter Verdichtungsgrad der Riesenchromosomen auch wieder abnehmen oder einem physiologischen Rhythmus unterworfen ist.

Summary

1. The giant chromosomes of *Phryne cincta* — $n = 3 + X(Y)$ — from larvae raised at different temperatures have been studied.

2. Breeding in low temperature (below 8° C.) results in larvae and imagos which are considerably larger than those raised at room temperature (above 20° C.). In the larger larvae the salivary glands and their nuclei are correspondently enlarged.

3. The 3 giant autosomes (2 to 4) differ from each other in easily recognisable characters such as length, banding pattern, presence of inversions. In relative length they correspond to the mitotic chromosomes. Short heterochromatic sections which probably contain the kinetochores, consist of diffuse (β -) and compact (α -) Heterochromatin. Autosomes 2 and 4 often show a long threadlike constriction within the α -heterochromatin. A shorter very thin constricted zone is present in the short arm of chromosome 2. No common chromocenter is formed, but occasional fusion of α -heterochromatic sections occurs. Larvae from lower temperature have bigger autosomes with clearer banding pattern but the temperature effect is not very pronounced.

4. The Y chromosome in males forms a small compact (α -) heterochromatic body uninfluenced by temperature conditions.

5. The X(1) chromosome is characterised by a considerable range of temperature-dependent variability in shape and structure. Under

ordinary room-temperature conditions it is a flat body which is broader and shorter than the autosomes. It is divided into a strongly staining and a faintly staining segment, both of which have a granular appearance. At low temperature on the contrary it has the aspect of a normal giant chromosome with about 80 distinct bands. Intermediates of lesser length and meandric structure are present in larvae grown at intermediate temperature.

6. The length ratio of chromosomes 4 and X is 8:1 at high temperature and 2.5:1 at low temperature (in mitotic chromosomes it is 2:1).

7. The same structural series as observed with lowering of temperature is present as a developmental sequence during larval growth at low temperature.

8. In certain mid-gut cells of old larvae (3 days before pupation) the relative length of X is greater than in salivary glands of the same individual. In some of the cells (3 to 19 percent) pairing of the homologues is incomplete or absent.

9. The temperature variability of the X is a new expression of its alloecy. The faintly staining segment is considered to be more strongly alloecy than the strongly staining one, because the former is less easily transformed to the normal banded state.

10. The structural types of the X are understandable on the basis of the polytene concept and of submicroscopic (or molecular) spiralsation or folding of the fibrils which are relatively free within the polytene compound. The transformation from the short to the long, banded form is explained by closer apposition and simultaneous stretching of the fibrils. It is possible that addition of DNA takes place during, and is causally related with, the stretching process.

11. The amount of stretch of the X seems to be controlled by the structural characters of the different sections (differing in extent of alloecy) and by internal and external environmental factors (tissue specificity, degree of polyteny, nutrition, temperature).

Literatur

- ALVERDES, F.: Die Kerne in den Speicheldrüsen der *Chironomus*-Larve. Arch. exper. Zellforsch. 9, 168—204 (1912). — AMBROSE, E. J.: The structure of chromosomes. Progr. Biophysics a. Biophysical. Chem. 6, 26—65 (1956). — AMBROSE, E. J., and J. A. V. BUTLER: Swelling and orientation phenomena with nucleinprotein films. Faraday Soc. 13, 261—271 (1953). — ASTBURY, W. T., and S. DICKINSON: α - β -intramolecular transformation of Myosin. Nature (Lond.) 135, 95 (1935). — BARIOZZI, C., and L. SEMENZA: A preliminary note on the biology and chromosome cycle of *Aphiochaeta xanthina* S. Amer. Naturalist 86, 123—124 (1952). — BAUER, H.: Der Aufbau der Chromosomen aus den Speicheldrüsen von *Chironomus thummi* KIEF. Z. Zellforsch. 23, 280—313 (1935). — Beiträge zur vergleichenden Morphologie der Speicheldrüsenchromosomen. Zool. Jb., Abt. allg. Zool. u. Physiol. 56, 239—276 (1936). — Die Istanbuler Hypothese von Entwicklung und Bau der

- Riesenchromosomen. Verh. Dtsch. Zool. Ges. Freiburg 1952, S. 275—278. — BAUER, H., u. W. BEERMANN: Die Polytenie der Riesenchromosomen. *Chromosoma* 4, 630—648 (1952). — BAYREUTHER, K.: Extrachromosomale feulgenpositive Körper (Nukleinkörper) in der Oogenese der Tipuliden. *Naturwiss.* 39, 71 (1952). — Die Oogenese der Tipuliden. *Chromosoma* 7, 508—557 (1955). — BEERMANN, W.: Chromomerenkonstanz bei *Chironomus*. *Naturwiss.* 37, 543—544 (1950). — Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chironomus tentans*. *Chromosoma* 5, 139—198 (1952a). — Chromosomenstruktur und Zelldifferenzierung in der Speicheldrüse von *Trichocladus vitripennis*. *Z. Naturforsch.* 7b, 237—242 (1952b). — BEERMANN, W., and G. F. BAHR: The submicroscopic structure of the Balbianing. *Exper. Cell Res.* 6, 195—201 (1954). — BELLING, J.: Contraction of chromosomes during maturation division in Lilium and other plants. *Univ. California Publ. Bot.* 14 (1928). — BORYSKO, E.: An electron microscope study of the giant chromosomes of Diptera by means of sections. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 92, 151—169 (1952). — COLE, A. C., and E. SUTTON: The absorption of ultraviolet radiation by bands of the salivary gland chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 9, 66—71 (1941). — DARLINGTON, C. D.: Meiosis in *Agapanthus* and *Kniphofia*. *Cytologia* 4 (1933). — Crossing-over and its mechanical relationship in *Chorthippus* and *Stauroderus*. *J. Genetics* 33, 465—500 (1936). — The chromosome as a physico-chemical entity. *Nature (Lond.)* 176, 1139—1144 (1955). — DARLINGTON, C. D., and L. LA COUR: Differential reactivity of the chromosomes. *Ann. of Bot., N.S.* 2, 615—625 (1938). — Nucleic acid starvation of chromosomes in Trillium. *J. Genetics* 40, 185—213 (1940). — FREY-WYSSLING, A.: Chromosomes, structure and size. *Arch. Klaus-Stiftg* 19, 451 (1944). — Submicroscopic morphology of protoplasma and its derivatives. New York: Elsevier P. C., Inc. 1948. — GEITLER, L.: Das Verhalten der Chromocentren von *Agapanthus* während der Mitose. *Österr. bot. Z.* 82, 277 bis 282 (1933). — Temperaturbedingte Ausbildung von Spezialsegmenten an Chromosomenenden. *Chromosoma* 1, 554—561 (1940). — HEITZ, E.: Das Heterochromatin der Moose. *I. Jb. wiss. Bot.* 69, 762—818 (1928). — Heterochromatin, Chromocentren, Chromomeren. *Ber. Dtsch. bot. Ges.* 47, 274 (1929). — Über α - und β -Heterochromatin sowie Konstanz und Bau der Chromomeren bei *Drosophila*. *Biol. Zbl.* 54, 588—609 (1934). — HEITZ, E., u. H. BAUER: Beweis für die Chromosomennatur der Kernschleifen in den Knäuelkernen von *Bibio hortulanus* L. *Z. Zellforsch.* 17, 67—82 (1933). — KLINGSTEDT, H.: Negative heterochromacy in Orthoptera chromosomes. *Mem. Soc. Faun. Phem.* 17, 166 (1941). — KOLLER, P. C.: The genetical and mechanical properties of the sex-chromosomes. IV. The golden hamster. *J. Genet.* 36, 177—195 (1938). — KOLLER, P. C., and C. D. DARLINGTON: The genetical and mechanical properties of the sex-chromosomes. I. *Rattus norvegicus* β . *J. Genet.* 29, 175—180 (1934). — KOSWIG, C., u. A. SENGÜN: Neuere Untersuchungen über den Bau der Riesenchromosomen der Dipteren. *Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul, Sér. B* 12, 107—121 (1947a). — Vergleichende Untersuchungen über die Riesenchromosomen der verschiedenen Gewebearten verschiedener Dipteren. *C. r. ann. Arch. Soc. Turque Sci. Phys. Nat.* 13, 94—101 (1947b). — Intra-individual variability of chromosome IV of *Chironomus*. *J. Hered.* 38, 235—239 (1947c). — KUNZE, E.: Untersuchung über die Paarungsaffinität bei Riesenchromosomen. *Chromosoma* 5, 501—510 (1953). — LEUCHTENBERGER, C., u. F. SCHRADER: Variation in the amounts of desoxyribosenucleic acid (DNA) in cells of the same tissue and its correlation with secretory function. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 38, 99—105 (1952). — MAZIA, D., and L. JAEGER: Nuclease action, protease action and histochemical tests on salivary chromosomes of *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 25, 456—461 (1939). — MECHTELKE, F.: Rever-

sible Strukturmodifikationen der Speicheldrüsenchromosomen von *Acrictolopus lucidus*. Chromosoma 5, 511—543 (1953). — Temperaturbedingte Chromosomen-segmentierung bei Sommer- und Wintergersten. Kulturpflanze 3, 127—135 (1956). — MIRSKY, A. E., and H. RIS: The chemical composition of isolated chromosomes. J. Gen. Physiol. 31, 7—18 (1947). — PAVAN, C.: Two types of heterochromatin in *Drosophila nebulosa*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 32, 137—145 (1946). — RIS, HANS, and HELEN CROUSE: Structure of the salivary gland chromosomes of Diptera. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 31, 321—327 (1945). — ROTHFELS, K. H., and R. W. DUNBAR: The salivary gland chromosomes of the black fly *Simulium vittatum* ZETT. Canad. J. Zool. 31, 226—241 (1953). — SCHRADER, F., and C. LEUCHTENBERGER: Variation in the amount of desoxyribose nucleic acid in different tissues of *Tradescantia*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 35, 464—468 (1949). — SCHULTZ, JACK: The nature of Heterochromatin. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 12, 179—191 (1947). — SENGÜN, A.: Vergleichend ontogenetische Untersuchungen über die Riesenchromosomen verschiedener Gewebearten der Chironomiden. Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul, Sér. B 16, 1—44 (1951a). — Meiotische und somatische Chromosomen von *Chironomus*-Larven. Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul, Sér. B 16, 345—350 (1951b). — The spiral structure of giant chromosomes. Istanbul Univ. Fak. Mecmuasi, Sér. B Rev. Fac. Sci. 19, 170—180 (1954a). — Variability of the banding patterns of giant chromosomes. J. Hered. 45, 119—122 (1954b). — SLIZYNSKI, B. M.: The sex bivalent of *Mus musculus* L. J. Genet. 53, 591—595 (1955). — STICH, H.: Stoffe und Strömungen in der Spindel von *Cyclops strenuus*. (Ein Beitrag zur Mechanik der Mitose.) Chromosoma 6, 199—236 (1954). — WHITE, M. J. D.: The effect of X-rays on mitosis in spermatogonial divisions of *Locusta migratoria*. Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B 1935, 119. — The effects of X-rays on the first meiotic division in three species of Orthoptera. Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B 1937, 124. — The cytology of the *Cecidomyiidae* (Diptera). III. The spermatogenesis of *Taxomyia taxi*. J. of Morph. 80, 1—24 (1947). — The cytology of the *Cecidomyiidae* (Diptera). IV. The salivary gland chromosomes of several species. J. of Morph. 82, 53—80 (1948). — A cytological survey of wild populations of *Trimerotropis* and *Circotettix* (Orthoptera, Acrididae). I. The chromosomes of twelve species. Genetics 34, 537—563 (1949). — WHITE, M. J. D., and N. H. NICKERSON: Structural heterozygosity in a very rare species of grasshopper. Amer. Naturalist 85, 239—246 (1951). — WOLF, B. E.: Die Chromosomen in der Spermatogenese einiger Nematoceren. Chromosoma 2, 192—246 (1941). — Die Chromosomen in der Spermatogenese der Dipteren *Phryne* und *Mycetobia*. Chromosoma 4, 148—204 (1950). — Beiträge zur Chiasmenfrage. Verh. Dtsch. Zool. Ges. Freiburg 1952, S. 295—299. — Numerische und strukturelle Variation der Geschlechts- und überzähligen Chromosomen bei der Mücke *Phryne cincta*. Verh. Dtsch. Zool. Ges. Tübingen 1954, 282—292. — Nachweis eines lokalisierten Chromatidenstück austausches im X-Chromosom von *Phryne cincta* mit Hilfe der Speicheldrüsenanalyse. Verh. Dtsch. Zool. Ges. Hamburg 1956 (im Druck).

Dr. B. E. WOLF, Genetisches Institut
der Freien Universität, Berlin-Dahlem, Rudeloffweg 9

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

CHROMOSOMENZAHLEN VON ARACEEN*

Von

PETER PFITZER

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. August 1956)

A. Einleitung

Gemessen am Artenreichtum der Familie liegen bislang nur sehr wenige cytologische Untersuchungen an Araceen vor. Die Ursache hierfür liegt zweifellos in ihrem fast ausschließlichen Vorkommen in tropischen und schwer zugänglichen Gebieten. Außerhalb der Tropen durchgeführte Untersuchungen sind entweder auf die wenigen Arten der gemäßigten Zonen oder auf die begrenzten Sammlungen der botanischen Gärten angewiesen. Das dort vereinigte Material hat jedoch den Nachteil, daß es sich um nur wenige Exemplare einer Art handelt, die, einmal importiert, vorwiegend vegetativ vermehrt und von einem Garten zum anderen weitergegeben wurde. In diesen Fällen liegen also nur Stichproben aus dem, vermutlich auch cytologisch, viel reichhaltigeren Material der natürlichen Verbreitungsgebiete vor. Zudem ist nicht auszuschließen, daß bei sexueller Fortpflanzung in Kultur, bewußt oder unbewußt, Bastardierungen vorgenommen wurden, wie sie, zumindest für eine Reihe von Formen der Gattung *Alocasia*, sicher sind.

Ungeachtet dieser Nachteile wurde die Bearbeitung des vorhandenen Materials versucht, um die cytologischen Kenntnisse der Familie etwas zu erweitern. Die vorliegende Veröffentlichung umfaßt den ersten Teil der Untersuchungen, dessen Hauptziel es war, die Chromosomenzahlen zu ermitteln und Anhaltspunkte für weitere wesentliche cytologische Probleme aufzudecken. Die daran anschließenden Untersuchungen an einigen Arten der Gattung *Anthurium* werden getrennt veröffentlicht werden.

B. Material und Methode

Cytologisch untersucht wurden 63 Arten aus 17 verschiedenen Gattungen der Familie der Araceen (Tabelle 1). Die Pflanzen, die ausschließlich Gewächshauskulturen entnommen sind, entstammen vorwiegend dem Botanischen Garten

* Unter Verwendung des ersten Teils einer Dissertation der Naturwissenschaftlich-mathematischen Fakultät der Universität Freiburg i. Br. — Herrn Prof. Dr. F. OEHLKERS danke ich für die großzügige Unterstützung und sein reges Interesse während der Arbeit sehr herzlich. Für wertvolle Hilfe möchte ich ferner Herrn Dr. P. EBERLE und Herrn Gartenmeister H. LEHMANN danken.

Freiburg; zusätzliches Material stellten der Palmengarten Frankfurt, der Botanische Garten Basel und die Fa. Wilhelm Pfitzer, Stuttgart, zur Verfügung. Für seine Überlassung möchte ich den genannten Unternehmen meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Als Fixierungsmittel wurde Alkohol-Eisessig (3:1), als Färbemittel 2,5%ige Karminessigsäurelösung mit 0,05% FeCl_3 -Zusatz verwandt.

Zur Untersuchung der *Meiosis* wurden die Blütenkolben in möglichst schmale Längstreifen geschnitten und die Antheren bzw. Samenanlagen erst bei der Verarbeitung freipräpariert. In Fällen eines nahezu synchronen Meiosisablaufs in sämtlichen Antheren (*Xanthosoma*, *Philodendron* u. a.) empfiehlt es sich, während einiger Tage dünne Querscheiben des Kolbens aus der Region der ♂ Blüten zu fixieren, da es sonst kaum möglich ist, die gesuchten Stadien zu erfassen. Die *Mitose* wurde nur zur ergänzenden Untersuchungen herangezogen. Infolge der Länge der Chromosomen und ihrer recht großen Anzahl war eine systematische Auswertung nur nach Vorbehandlung mit 0,002 mol wässriger 8-Oxychinolinlösung (Oxin) vor der Fixierung möglich (TJIO und LEVAN 1950). Die notwendige Einwirkungsdauer zur Verkürzung der Chromosomen betrug je nach Dicke der abgetrennten Wurzelspitzen 3–7 Std. Nach 2–3 Tagen Färbung wurden die Wurzelspitzen mit 50%iger Essigsäure im Thermostaten bei 58°C $\frac{1}{3}$ –1 Std differenziert. Diese Mazerierung der kleinzelligen Gewebe ermöglicht bei der anschließenden Herstellung von Quetschpräparaten ein einwandfreies Ausbreiten. Einige zweifelhafte Arten wurden an Hand der Tabellen des Pflanzenreichs von A. ENGLER (1905 bis 1920) nachbestimmt.

C. Empirischer Teil

Zur Orientierung über die cytologischen Verhältnisse der Araceen wurden an Meiosis-Stadien die Chromosomenzahlen von 60 Arten zum überwiegenden Teil neu bestimmt. Von 3 Arten, die in unseren Kulturen keine Blüten bilden, fanden allein die Mitosen des Wurzelspitzenmeristems Verwendung, die sonst nur in Einzelfällen zur Ergänzung herangezogen wurden. Tabelle 1 zeigt neben den neuermittelten Chromosomenzahlen die bereits in der Literatur vorhandenen Angaben. Alle Zählungen wurden an mindestens 10 einwandfreien Zellen durchgeführt. Die Anordnung der Gattungen in Tabelle 1 erfolgt alphabetisch, die der Arten nach steigenden Chromosomenzahlen. Für eine sinnvolle systematische Anordnung der umfangreichen Familie liegt noch zu wenig Zahlenmaterial vor.

Die niederste der hier angeführten Chromosomenzahlen besitzt *Synгонium vellozianum* SCHOTT mit $n = 12$; die kleinste der bislang überhaupt bei den Araceen sicher ermittelten Zahlen beträgt $n = 9$ (*Spathiphyllum patinii* JÜSSEN 1929); die höchste $2n = 126$ für *Dieffenbachia spec.* (MOOKERJEA 1955).

Einige Erläuterungen zu den in der Tabelle 1 zusammengefaßten Zahlen sind notwendig.

Aglaonema. Die von GOW 1908 für Pollen angegebene Zahl $n = 8$ darf wohl angesichts der hier gefundenen polyploiden Reihe als überholt gelten. Von der Grundzahl 20 leiten sich triploide, tetraploide und hexaploide Formen ab. Die Meiosis verläuft bei den Diploiden und Tetraploiden normal. Die Triploiden und Hexaploiden bilden dagegen keinen fertilen Pollen aus; *A. commutatum* und wohl auch *A. roebellinii* pflanzen sich durch apomiktisch entstandene Samen fort, während die übrigen Arten nur vegetativ vermehrt werden können.

Tabelle 1. Chromosomenzahlen

	Neubestimmungen		Ältere Angaben		
	Meiosis <i>n</i>	Mitose <i>2n</i>	<i>n</i>	<i>2n</i>	Autor
<i>Aglaonema</i>					
<i>angustifolium</i> N. E. BR.	20				
<i>costatum</i> N. E. BR. . . .	20				
<i>hospitum</i> WILLIAMS . . .	20				
<i>pictum</i> KTH.	20		8	16	Gow (1908)
<i>roebellinii</i> GENTIL . . .		60			
<i>roebellinii</i> Bastard . . .	ca. 30	60			
<i>simplex</i> BLUME	30				
<i>treubii</i> ENGL.	40				
<i>commutatum</i> SCHOTT . .		118—120			
<i>Alocasia</i>					
<i>chantrieri</i> E. ANDRÉ					
(= <i>cadieri</i> × <i>sanderiana</i>)	14				
<i>cuprea</i> C. KOCH	14				
<i>sanderiana</i> VAN HOUTT.	14				
<i>sanderiana magnifica</i> hort.	14				
<i>uhinkii</i> hort.					
(= <i>macrorrhiza</i> × <i>indica</i>)		42			
<i>macrorrhiza</i> SCHOTT . .	28			26	MATSUURA and SUTO (1935)
				28	KURAKUBO (1940)
				28	ITO (1942)
<i>houltiana</i> var. <i>superba</i> .	ca. 30				
<i>Anthurium</i>					
<i>andreaeanum</i> LIND. . . .			ca. 15		GAISER (1927)
var. „Goliath“	15		16		HAASE-BESSEL (1928)
				30	ITO (1942)
				30	SIMMONDS (1954)
<i>consobrinum</i> SCHOTT . .	15				
<i>crystallinum</i> LIND. et . .	15	30	ca. 15		GAISER (1927)
ANDRÉ.	+0—2B	+0—2B		34	MOOKERJEA (1955)
<i>forgetii</i> N. E. BR.	15	30			
	+0—2B	+0—2B			
<i>grusonii</i> hort.	15				
<i>hookeri</i> KTH.	15		ca. 15	30	GAISER (1927)
					KURAKUBO (1940)
<i>macrolobum</i> hort.	15				
<i>magnificum</i> LIND.	15	30	ca. 15		GAISER (1927)
	+0—2B	+0—2B	16		HAASE-BESSEL (1928)
<i>montfontanense</i> ANDRÉ . .					
(= <i>andreaeanum</i> × <i>veitchii</i>)	15				
<i>pentaphyllum</i> DON . . .	15				
<i>radicans</i> C. KOCH	15		ca. 24		GAISER (1927)
<i>scherzerianum</i> hybr. . . .	15		ca. 15		GAISER (1927)
			16		HAASE-BESSEL (1928)
				30	KURAKUBO (1940)
				30	ITO (1942)
			16	32	MALVESIN-F. (1945)
<i>sellowianum</i> KUNTH. . . .	15				
<i>veitchii</i> MAST.	15		15		GAISER (1927)
<i>warocqueanum</i> MOORE . .	15			ca. 30	GAISER (1927)
<i>scandens</i> ENGL.	24		16		CAMPBELL (1905)
			ca. 24		GAISER (1927)
<i>digitatum</i> G. DON	30			ca. 60	GAISER (1927)

Tabelle 1 (Fortsetzung)

	Neubestimmungen		Ältere Angaben		
	Meioseis n	Mitose 2n	n	2n	Autor
<i>Anubias lanceolata</i> N. E. BR. . . .	24				
<i>Ariopsis peltata</i> NIMMO	42			80	MALVESIN-F. (1945)
<i>Caladium bicolor</i> VENT.				30 48 30 27—32 28—31	KURAKUBO (1940) ITO (1942) SIMMONDS (1954) SHARMA u. DAS (1954) MOOKERJEA (1955)
„O. V. Zangen“	15	30			
„Porto Rico“	15				
„Scarlet Pimpernel“	15				
„Triomphe de l'exposition	15				
<i>humboldtii</i> SCHOTT		19			
<i>Colocasia antiquorum</i> var. <i>aquatilis</i> HASSK.		28			
<i>Dieffenbachia bausei</i> hort.	ca. 17	34			
(= <i>picta</i> × <i>weirii</i>)	17				
<i>leopoldi</i> LIND.	17	34			
<i>macrophylla</i> POEPP.	17		8		
<i>picta</i> SCHOTT	17			34	Gow (1908) MOOKERJEA (1955)
<i>picta</i> var. <i>jenmannii</i> ENGL.	17				
<i>seguine</i> ENGL.	17				
<i>Lasia spinosa</i> THWAIT	13				
<i>Monstera deliciosa</i> hort.	30			24 56	DARLINGTON und JANAKI-AMMAL (1945) MALVESIN-F. (1945)
<i>Philodendron</i> rankende Formen:					
<i>imbe</i> SCHOTT	17				
<i>verrucosum</i> MATH.	17				
stammbildende Formen:					
<i>bipinnatifidum</i> SCHOTT	18				
<i>undulatum</i> ENGL.	18				
<i>Spathicarpa sagittifolia</i> SCHOTT . .	17				
<i>Spathiphyllum harveyanum</i> hort. . . .	15	30			
<i>floribundum</i> N. E. BR.	30	60			
<i>Syngonium vellosianum</i> SCHOTT . .	12				

Tabelle 1 (Fortsetzung)

	Neubestimmungen		Ältere Angaben		
	Meiosis n	Mitose $2n$	n	$2n$	Autor
<i>Xanthosoma</i>					
<i>atrovirens</i>					
C. KOCH et BAUCHÉ .	13				
<i>lindenii</i> ENGL.	13				
<i>robustum</i> SCHOTT . . .	13				
<i>violaceum</i> SCHOTT . .		26		24	MALVESIN-F. (1945)
<i>Zamioculcas</i>					
<i>zamiifolia</i> ENGL. . . .	17			32	MALVESIN-F. (1945)
<i>Zantedeschia</i>					
<i>aethiopica</i> hort. . . .	16		16 12		OVERTON (1909) MICHELL (1916)
				32	ITO (1942)
				32	MALVESIN-F. (1945)
				32	MOOKERJEA (1955)

Im einzelnen von Interesse ist das Verhalten der triploiden *A. simplex*, die in der Metaphase I der Meiosis 20 Bivalente und 20 Univalente aufweist. Wie schwach gequetschte Präparate in Pol- und Seitenansicht zeigen, werden die Univalente noch vor Trennung der Bivalente rein zufällig an die Pole verteilt. Abb. 1 zeigt die extreme Verteilung der Univalente von 3:16 auf die beiden Pole, während eines noch am Rand der Metaphasenplatte liegt. Nach Trennung der Bivalente in der Anaphase (Abb. 2) teilen sich die in der Äquatorialplatte zurückgebliebenen Univalente und die Chromatiden gelangen, mindestens zum Teil, ebenfalls an die Pole. Diese Verteilungsweise der Univalente legt eine zu jedem Pol gerichtete Strömung während der Meiosis nahe, ähnlich der von STICH (1954) für die Mitose nachgewiesenen. Kommen die Univalente in der frühen Metaphase zwischen die beiden Strömungen zu liegen, so bleiben sie bis zu ihrer Teilung in der späten Anaphase dort zurück, andernfalls werden sie zu einem der beiden Pole transportiert. *A. simplex* führt die Entwicklung der ungleich großen Pollen bis zur Differenzierung in generativen und vegetativen Kern durch, anschließend tritt jedoch Degeneration der immer sehr dünnwandigen Zellen ein.

Die als *A. roebellinii*-Bastard bezeichnete Triploide zeigt eine völlig unregelmäßige Verteilung der auftretenden Bi- und Univalente während des ersten Teilungsschritts, und der zweite Teilungsschritt besteht überhaupt nur noch in einem Auseinanderfallen der Chromosomen in etwa 120 Spalthälften.

A. commutatum besitzt mit $2n = 118$ bis 120 die höchste hier festgestellte Chromosomenzahl. Mindestens 5 einwandfreie Zählungen je Wurzelspitze ergaben für 6 Nachkommen einer Pflanze mit $2n = 119$

Chromosomen 1 Pflanze mit 118, 3 mit 119 und 1 mit 120. Eine weitere Pflanze besaß sowohl Zellen mit 118 als auch 120 Chromosomen; hier treten also Schwankungen der Chromosomenzahl im somatischen Gewebe

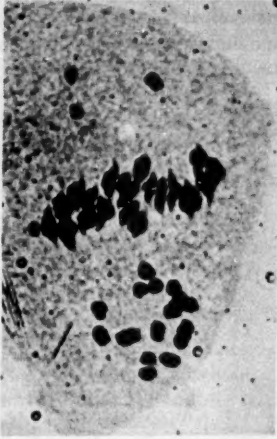


Abb. 1

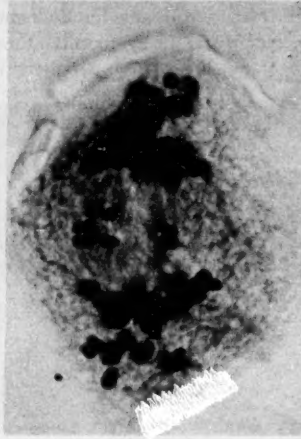
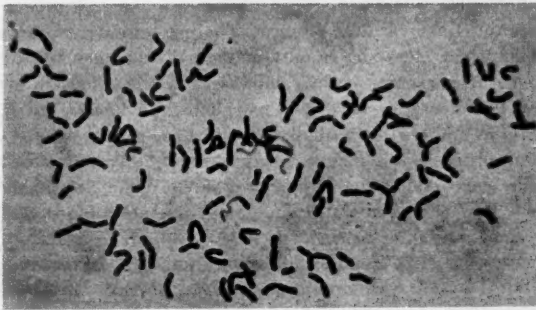


Abb. 2

Abb. 1 und 2. *Aglaonema simplex*. PMZ. 1. Zufallsgemäße und unvollständige Verteilung der Univalente an die Pole in der frühen Anaphase I. 2. Teilungen der in der Äquatorialplatte zurückgebliebenen Univalente in der späten Anaphase I. 800 \times

Abb. 3. *Aglaonema commutatum*. WS. $2n = 119$. 620 \times

auf, wie sie insbesondere für triploide Anthurien sehr typisch sind. Abb. 3 zeigt eine Zelle mit $2n = 119$ Chromosomen nach 6stündiger Oxin-Einwirkung; die dem Nucleolus verbundenen Teile der SAT-Chromosomen sind dabei weniger verkürzt und erscheinen als ausgezogene Fäden. Meist

sind 4 SAT-Chromosomen feststellbar, in einzelnen Fällen 5, jedoch niemals 6, wie dies eigentlich bei der hexaploiden Art zu erwarten wäre, eine Beobachtung, die sich mit den Befunden an anderen polyploiden Formen deckt.

Während der Meiosis der Pollenmutterzellen treten in allen Stadien Degenerationen auf. Ein normal durchgeführter zweiter Teilungsschritt war nicht zu beobachten. Obgleich nun keine Pollen gebildet werden,

tragen die Pflanzen reichlich Früchte mit keimfähigen Samen, die somit apomiktisch entstanden sein müssen.

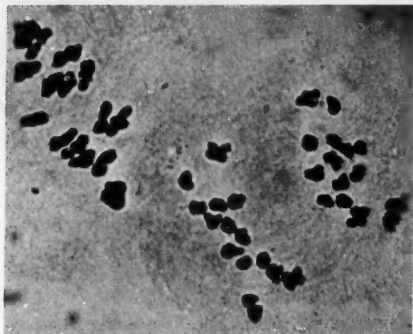


Abb. 4. *Anthurium sellowianum*. PMZ. Meta- und Anaphase I. $n = 15$. 1000 \times

CAMPBELL (1903) fand, daß in den vielkernigen und unpolarisierten Embryosäcken von *A. commutatum* der Embryo an ganz verschiedenen Stellen entstehen kann, nachdem zuvor Kernverschmelzungen zu beobachten sind. Die durch Verschmelzung entstandenen Riesenkerne, die CAMPBELL an Schnittpräparaten beobachtete, lassen sich

auch in Quetschpräparaten der Samenanlagen zeigen. Schrittweise können bis zu 5 und mehr Kerne miteinander verschmelzen und auf diese Weise einen hochpolyploiden Riesenkern bilden.

Alocasia. *A. macrorrhiza* SCHOTT: Die hier untersuchte tetraploide Form zeigt in der Metaphase I Multivalente und ungleichmäßige Verteilung der Chromosomen in der Anaphase I, dürfte also autotetraploid sein. Der Pollen ist zu etwa 60% morphologisch normal ausgebildet.

A. uhlenckii hort. ist ein triploider Bastard der tetraploiden *A. macrorrhiza* SCHOTT und der diploiden *A. indica* SCHOTT ($2n = 28$, MOOKERJEA 1955). Die sehr wüchsigen Pflanzen blühen nicht; vegetativ stark wachsende Triploide kommen in anderen Araceengattungen auch wild vor, so *Xanthosoma helleborifolium* ($3n = 39$) als Unkraut auf Trinidad (SIMMONDS 1954) und eine Form von *Colocasia antiquorum* SCHOTT mit $3n = 42$ Chromosomen als Kulturpflanze (NAKAJIMA 1936, KURAKUBO 1940, ITO 1942, DARLINGTON und JANA-KI-AMMAL 1945, MOOKERJEA 1955).

Anthurium. Chromosomenzahlen von Anthurien wurden erstmals 1927 in größerem Umfang von GAISER an Schnittpräparaten ermittelt und dabei als allgemeine Grundzahl $n = 15$ angegeben. Neben zahlreichen Arten mit $n =$ etwa 15 fanden sich drei Tetraploide mit $n =$ etwa 30 (*A. digitatum*, *wallisi* und *crassinervium*) zwei und Arten mit $n =$ etwa 24 (*A. scandens* und *radicans*). 1928 fand HAASE-

BESELL $n = 16$ für *A. magnificum*, *andreaeanum* und *scherzerianum*. KURAKUBO (1940) und IRO (1942) bestätigten $2n = 30$ für *A. scherzerianum*, während MALVE-SIN-F. (1945) wieder $n = 16$ und $2n = 32$ angibt. KURAKUBO fand ferner eine Form von *A. calamus* mit $2n = 44$ Chromosomen. 1955 bestimmte MOOKKEJRA für *A. crystallinum* $2n = 34$ und für sieben weitere Arten die Diploidzahlen 34, 35, 56 und 63.

Die eigenen Untersuchungen gaben in 12 Fällen die Zahl $n = 15$ (Tabelle 1, Abb. 4), darunter fünf *A. scherzerianum*-Formen und *A. radicans*. Für *A. scandens* und *digitatum* konnten die Angaben von GAISER mit $n = 24$ bzw. $n = 30$ bestätigt werden. Unter den zur Verfügung stehenden Pflanzen der drei Arten *A. magnificum*, *crystallinum* und *forgetii* fanden sich Exemplare mit $2n = 30$, 31 und 32 Chromosomen (Abb. 8). Es zeigte sich, daß in allen von $2n = 30$ abweichenden Fällen die zusätzlichen Chromosomen homolog sind und es sich dabei um B-Chromosomen eines einheitlichen Typs handelt, der an seiner Struktur während der Mitose leicht erkennbar ist.

Die Untersuchungen, die sich mit der Struktur der B-Chromosomen, ihrem Verhalten während der Meiosis, der Weitergabe bei sexueller Fortpflanzung und ihren Auswirkungen befassen, werden getrennt veröffentlicht werden; ebenso die Befunde über die in Kreuzungen spontan aufgetretenen triploiden Formen von *Anthurium crystallinum*, in deren Wurzelspitzen als Folge von Reduktionsmitosen stark schwankende Chromosomenzahlen vorliegen.

Caladium. Für *C. bicolor* VENDT. geben KURAKUBO (1940) und SIMMONDS (1954) für Material aus Trinidad $2n = 30$ an. SHARMA und DAS (1954) fanden bei Pflanzen aus Calcutta als Grundzahl $n = 14$ und daneben auch Zellen mit 27 bis 32 Chromosomen zu etwa 2–3% in Wurzelspitzen. Die Pollenkörner dieser Pflanzen waren zu 90% steril. IRO (1942) fand eine vermutlich triploide Form mit 48 Chromosomen.

Die vier hier untersuchten Sorten von *C. bicolor* zeigten übereinstimmend 15 Bivalente in der Meiosis und 30 Chromosomen in den Wurzelspitzen. Der Pollen war zu 98,2% normal ausgebildet.

Zwischen den stäubenden Pollen lagen zahlreiche auffallende, bis zu Pollengröße erreichende Calciumoxalat-Trihydrat-Kristalle in einer Form (Prismen mit zwei

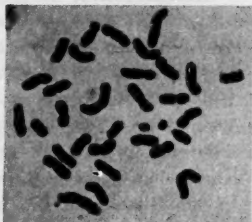


Abb. 5. *Anthurium magnificum*.
WS. $2n = 31$. 1000 \times

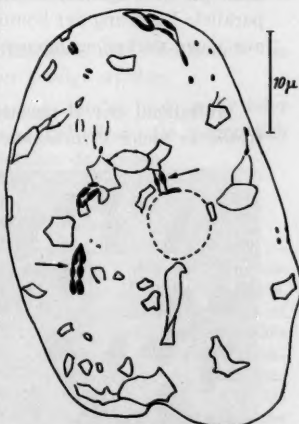


Abb. 6. *Xanthosoma robustum*.
Kern einer Raphidenzelle mit
Chromomerenstruktur der
Chromozentren

Pyramiden), wie sie in den lebenden Zellen nicht auftritt. Vermutlich handelt es sich um Rückstände eines periplasmodialen Tapetums. Weitere Araceen, zwischen deren Pollen derartige Kristalle auftreten, sind die *Dieffenbachia*- und *Xanthosoma*-Arten.

Xanthosoma. *X. robustum* gehört, ebenso wie *Anubias*, *Lasia* und *Zantedeschia* zu den Araceen mit partiell heterochromatischen Chromosomen, im Gegensatz etwa zu den rein euchromatischen *Aglaoanema*- und *Dieffenbachia*-Arten. Während die Ruhekerne der euchromatischen Araceen im allgemeinen eine völlig gleichmäßige Struktur zeigen, sind in den Arbeitskernen ausgebildeter Raphidenzellen der euchromatischen *A. comutatum* dem Nucleolus anliegende, sonst nicht erkennbare kugelförmige Körperchen sichtbar, die vermutlich von den Satelliten gebildet werden. In den Ruhekernen der schwach heterochromatischen Anthurien sind verschieden stark gefärbte Bezirke körniger Struktur erkennbar, während in einigen Arbeitskernen (Raphidenzellen, Tapetum u. a.) unscharf begrenzte Sammelchromozentren zu sehen sind. Ähnliche Veränderungen der Kernstruktur in Abhängigkeit von der Funktion der Zellen haben bei Araceen GRAFL (1940) und GEROLA (1955) beobachtet. Die Sammelchromozentren der Raphidenzellkerne von *X. robustum* zeigen vereinzelt auch ihre Chromomerenstruktur (Abb. 6); die dabei zu beobachtende parallele Lagerung der homologen Chromosomen erklärt sich vermutlich aus einer vorhergegangenen Endomitose.

D. Diskussion

Auffallend bei Betrachtung der Chromosomenzahlen ist das Auftreten so vieler Primzahlen wie 11 (*Ambrosinia bassii*, VIGNOLI 1939), 13, 17 und 19. Allein die Haploidzahl 17 kommt in Tabelle 1 in vier verschiedenen Gattungen vor (Abb. 7).

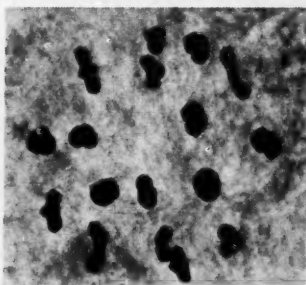


Abb. 7. *Spathicarpa sagittifolia*. PMZ.
 $n = 17$. 1000 \times

Die von vielen Monokotylen (DARLINGTON und WYLIE 1955) bekannte Reihe mehrerer aufeinanderfolgender Zahlen als Haploidzahlen zeigt die Gattung Philodendron mit $n = 15$ (SIMMONDS 1954), $n = 16$ (MALVESIN-F. 1945 und MOOKERJEA 1955), $n = 17$ (MATSUURA und SUTO 1938) und $n = 18$. Derartige Reihen und die erwähn-

ten Primzahlen setzen eine schrittweise Erhöhung der Chromosomenzahlen voraus und lassen ein Zurückführen sämtlicher Araceen auf eine Grundzahl (MOOKERJEA 1955) sehr fraglich erscheinen.

Zieht man die bereits vorhandenen Literaturangaben mit heran, so ist klar ersichtlich, daß es von manchen Arten Rassen mit verschiedenen Chromosomenzahlen gibt; so von *Anthurium radicans*, für das bisher nur

die von GAISER (1927) angegebene Zahl von n = etwa 24 vorlag, oder von *Monstera deliciosa* mit n = 12 (DARLINGTON und JANAKI-AMMAL 1945), n = 28 (MALVESIN-F. 1945) und n = 30.

Ob es sich bei der triploiden *Aglaonema simplex* tatsächlich um eine Wildform handelt, ist nicht entscheidbar, doch kommen triploide Araceen nachweislich auch wild vor (SIMMONDS 1954).

Alles, was bisher über die vielfältigen Chromosomenzahlenverhältnisse bekannt wurde, weist darauf hin, daß sich diese Familie noch im Stadium starker Entwicklung befindet.

Zusammenfassung

1. Von 63 Araceenarten wurden die Chromosomenzahlen vorwiegend an Stadien der Meiosis bestimmt (Tabelle 1).
2. Für *Aglaonema commutatum* wurde apomiktische Fortpflanzung festgestellt.
3. Überzählige Chromosomen der *Anthurium*-Arten *magnificum*, *crystallinum* und *forgetii* erwiesen sich als akzessorische oder B-Chromosomen eines einheitlichen Typs.
4. Für die Raphidenzellkerne von *Xanthosoma robustum* konnte die Chromomerenstruktur der Chromozentren gezeigt werden.
5. Zwischen den Pollen einiger Araceen fanden sich mehr oder weniger große Kristalle von Calciumoxalat-Trihydrat, die vermutlich Rückstände eines periplasmodialen Tapetums darstellen.

Literatur

- CAMPBELL, D. H.: Studies on the *Araceae*. Ann. of Bot. 17, 665—688 (1903). — Studies on the *Araceae*. III. Ann. of Bot. 19, 329—349 (1905). — DARLINGTON, C. D., and E. K. JANAKI-AMMAL: Chromosome atlas of cultivated plants. London 1945. — DARLINGTON, C. D., and A. P. WYLIE: Chromosome atlas of flowering plants. London 1955. — DELAY, G.: Nombres chromosomiques chez les phanérogames. Rev. Cytol. (Paris) 12 (1951). — ENGLER, A.: Das Pflanzenreich, Bd. IV, 23 A—F. Leipzig 1905—1920. — GAISER, O.: Chromosome numbers and species characters in *Anthurium*. Trans. Roy. Soc. Canada, Sect. V, Ser. III 21, 1—137 (1927). — GEROLA, F.: Ricerche sulla citofisiologia della segregazione II: cellule e rafidi. Caryologia (Pisa) 7, 114—144 (1955). — GOW, J. E.: Studies in *Araceae*. Bot. Gaz. 46, 35—42 (1908). — GRAFL, I.: Cytologische Untersuchungen an *Sauromatum guttatum*. Österr. bot. Z. 89, 81—118 (1940). — HAASE-BESSELL, G.: Karyologische Untersuchungen an *Anthurium andreanum*, *A. scherzerianum* und *A. magnificum*. Planta (Berl.) 6, 767—789 (1928). — ITO, T.: Chromosomen und Sexualität von der *Araceae*. I. Cytologia (Tokyo) 12, 313—325 (1942). — JÜSSEN, F. J.: Die Haploidgeneration der Araceen und ihre Verwertung für das System. Bot. Jb. 62, 155—283 (1929). — KURAKUBO, Y.: Über die Chromosomenzahlen von *Araceae*-Arten. 1940. Zit. nach DARLINGTON u. WYLIE 1955. — MALVESIN-F.: 1945. Zit. nach DELAY 1951. — MATSUURA, H., and T. SUTO: Contribution to the idiogram study in phanerogamous plants. I. J. Fac. Sci. Hokkaido

5, 33—75 (1935). — MICHELL, M. R.: The embryosac of the *Richardia africana* Kth. Bot. Gaz. 61, 325—336 (1916). — MOOKERJEE, A.: Cytology of different species of Aroids with a view to trace the basis of their evolution. Caryologia (Pisa) 7, 221 bis 291 (1955). — NAKAJIMA, G.: Chromosome numbers in some crops and wild angiosperms. Jap. J. Genet. 12, 211—218 (1936). — OVERTON, J. B.: On the organisation of nuclei in pollen mother cells of certain plants with especial reference to permanence of chromosomes. Ann. of Bot. 23, 19—61 (1909). — SHARMA, A. K., and N. K. DAS: Studies of karyotypes and their alterations in aroids. Agron. lusitana 16, 23—48 (1954). — SIMMONDS, N. W.: Chromosome behaviour in some tropical plants. Heredity (Lond.) 8, 139—146 (1954). — STICH, H.: Stoffe und Strömungen in der Spindel von *Cyclops strenuus*. Chromosoma 6, 199—236 (1954). — ТЮ, J. H., y A. LEVAN: The use of oxyquionoline in chromosome analysis. An. Estacion exper. Aula Dei 2, 21—64 (1950). — VIGNOLI, L.: Gametofiti e cromosomi di *Ambrosinia bassii* L. Lav. Inst. Bot. Palermo 17, 54—80 (1939).

Dr. P. PFITZER, Stuttgart-Fellbach, Teschenstr. 53
